

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE AISLAMIENTOS  
CLÍNICOS DE *Stenotrophomonas maltophilia* EN DOS HOSPITALES DE TERCER  
NIVEL DE MÉXICO

Por

Q.C.B. SANDRA ABRIL HERRERA HEREDIA

Como requisito para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Marzo 2017

MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE AISLAMIENTOS  
CLÍNICOS DE *Stenotrophomonas maltophilia* EN DOS HOSPITALES DE TERCER  
NIVEL DE MÉXICO

Comité de Tesis:

---

Dra. Licet Villarreal Treviño  
Director

---

Dra. Samantha Maribel Flores Treviño  
Secretario

---

Dra. Norma Laura Heredia Rojas  
Vocal 1

---

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna  
Vocal 2

---

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero  
Vocal 3

MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Stenotrophomonas maltophilia* EN DOS HOSPITALES DE TERCER NIVEL DE MÉXICO.

Presentado por: Q.C.B. Sandra Abril Herrera Heredia

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Laboratorio Central del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) del servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología y al laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad (LADIME) y al departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” por todo el apoyo brindado.*

*A la Dra. Licet Villarreal por todo el apoyo brindado, por su bondad, su paciencia y la dedicación que nos brinda a todos y a cada uno de sus alumnos.*

*A la Dra. Samantha Flores, por su infinita paciencia, por todo el tiempo que me brindó y sobre todo por estar siempre conmigo a lo largo de todo este proyecto.*

*A la Dra. Elvira Garza por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por todos los conocimientos compartidos, por sus consejos, por su tiempo, por compartirme su pasión por la ciencia y también por sus llamadas de atención.*

*A mi madre por siempre creer en mí y por estar a mi lado a pesar de todas las dificultades vividas. Por tus consejos, por entenderme y apoyarme a cada momento de mi vida, aun cuando las cosas se pusieran difíciles. No sé qué sería de mí sin tí. Te amo con todo mi corazón.*

*A Adrián “Clostri friend”, a Jessi “Bordetellita bebé”, y a Payola, por tenerme tanta paciencia, por brindarme su ayuda y sus conocimientos desde el principio y hasta el término de este proyecto y siempre hacerlo con una gran sonrisa; se los agradezco infinitamente. Muchas gracias también por los momentos divertidos, el trabajo nunca hubiera sido tan divertido sin ustedes.*

## DEDICATORIA

*A mi madre, que ha estado conmigo siempre y que estará hasta el final.*

# ÍNDICE

| SECCIÓN  | Página |
|--|--------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....   | I      |
| <b>DEDICATORIA</b> .....   | II     |
| <b>LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....  | VIII   |
| <b>RESUMEN</b> .....   | IX     |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | X      |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1      |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....   | 3      |
| 2.1 Generalidades.....   | 3      |
| 2.2 Historia y Taxonomía de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....                  | 3      |
| 2.3 Características Microbiológicas.....   | 4      |
| 2.4 Factores de virulencia y patogénesis.....  | 4      |
| 2.4.1 Producción de enzimas .....  | 5      |
| 2.4.2 Fimbrias .....   | 5      |
| 2.4.3 Flagelos.....  | 6      |
| 2.4.4 Lipopolisacáridos.....   | 6      |
| 2.4.5 Biopelícula.....   | 6      |
| 2.5 Importancia Clínica.....   | 8      |
| 2.6 Epidemiología .....  | 9      |
| 2.7 Factores de Riesgo .....   | 10     |
| 2.8 Transmisión.....   | 10     |
| 2.9 Manifestaciones clínicas asociadas con infecciones por <i>S. maltophilia</i> ..... | 11     |
| 2.9.1 Infecciones en tracto respiratorio .....   | 11     |
| 2.9.2 Bacteriemia.....   | 11     |
|  | III    |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.9.3 Endocarditis .....   | 11        |
| 2.9.4 Piel y tejidos blandos .....   | 12        |
| 2.9.5 Otras manifestaciones clínicas.....                                  | 12        |
| 2.10 Tratamiento .....   | 12        |
| 2.10.1 Trimetoprim-sulfametoxazol .....                                    | 13        |
| 2.10.2 Ticarcilina-ácido clavulánico y ácido clavulánico-aztreonam .....   | 13        |
| 2.10.3. Cefalosporinas y carbapenemas.....                                 | 13        |
| 2.10.4 Fluoroquinolonas .....  | 14        |
| 2.10.5 Aminoglucósidos .....   | 14        |
| 2.10.6 Cloranfenicol y Tetraciclinas.....                                  | 14        |
| 2.10.7 Polimixinas .....   | 15        |
| 2.11 Mecanismos de Resistencia a los Antimicrobianos .....                 | 15        |
| 2.11.1 Mecanismos de Resistencia inespecíficos a los antimicrobianos ..... | 16        |
| 2.11.1.1 Membrana externa y sistemas de expulsión activa.....              | 16        |
| 2.11.1.2 Proteínas de membrana externa. ....                               | 18        |
| 2.11.2 Mecanismos de resistencia asociados a $\beta$ -lactamasas .....     | 18        |
| 2.11.3 Mecanismos de resistencia asociados a TMP-SXT .....                 | 19        |
| 2.11.4 Mecanismos de resistencia asociados a aminoglucósidos.....          | 19        |
| 2.11.5 Mecanismos de resistencia asociados a macrólidos .....              | 19        |
| <b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>4. HIPÓTESIS .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>5. OBJETIVO .....</b>   | <b>23</b> |
| 5.1 Objetivo General.....  | 23        |
| 5.2 Objetivos Específicos.....   | 23        |
| <b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>24</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 6.1 Obtención de los aislamientos. ....  | 24        |
| 6.2 Identificación bioquímica de los aislamientos. ....                              | 24        |
| 6.3 Identificación molecular de los aislamientos. ....                               | 24        |
| 6.3.1 Extracción de DNA genómico por lisis térmica. ....                             | 24        |
| 6.3.2 Identificación de especie mediante PCR. ....                                   | 25        |
| 6.4 Susceptibilidad a los antimicrobianos. ....                                      | 25        |
| 6.5 Detección de los elementos genéticos asociados a resistencia antimicrobiana .... | 27        |
| 6.6 Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF. ....                          | 28        |
| 6.6.1 Extracción del material genético por lisis térmica. ....                       | 28        |
| 6.6.2 Extracción de RNA total. ....  | 28        |
| 6.6.3 Cuantificación del RNA total. ....   | 28        |
| 6.6.4 RT-PCR. ....   | 28        |
| 6.7 Formación de biopelícula. ....   | 29        |
| 6.8 Análisis estadísticos. ....  | 30        |
| <b>7. RESULTADOS. ....</b>   | <b>31</b> |
| 7.1 Aislamientos clínicos de <i>S. maltophilia</i> . ....                            | 31        |
| 7.2 Susceptibilidad a los antimicrobianos. ....                                      | 31        |
| 7.3 Detección de los elementos genéticos asociados a resistencia antimicrobiana .... | 32        |
| 7.4 Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF. ....                          | 32        |
| 7.5 Formación de biopelícula. ....   | 33        |
| <b>8. DISCUSIÓN. ....</b>  | <b>34</b> |
| <b>9. CONCLUSIONES. ....</b>   | <b>38</b> |
| <b>10. PERSPECTIVAS. ....</b>  | <b>39</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>  | <b>40</b> |
| <b>RESUMEN BIOGRÁFICO. ....</b>  | <b>51</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>ANEXO I.....</b>  | <b>52</b> |
| Preparación de reactivos y soluciones .....  | 52        |
| <b>ANEXO II. ....</b>  | <b>53</b> |
| Características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos clínicos de<br><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> incluidos en este estudio ..... | 53        |

## ÍNDICE DE TABLAS

| Tablas   | Página |
|--|--------|
| 1. Primers para amplificación del gen 16S de rRNA  | 24     |
| 2. Criterios de evaluación de <i>S. maltophilia</i> contra antimicrobianos.  | 25     |
| 3. Criterios de evaluación de no- <i>Enterobacteriaceae</i> contra los antimicrobianos.  | 25     |
| 3. Criterios de evaluación de no- <i>Enterobacteriaceae</i> contra los antimicrobianos, <i>continuación</i> .                    | 26     |
| 4. Primers para amplificación de los genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> y <i>sul3</i> .   | 26     |
| 5. Primers utilizados para evaluar la expresión de SmeABC y SmeDEF.  | 28     |
| 6. Concentración mínima inhibitoria y perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de <i>S. maltophilia</i> . | 31     |
| 7. Relación de la susceptibilidad a los antimicrobianos con la expresión de SmeABC y SmeDEF in <i>S. maltophilia</i> .           | 32     |

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                     |   |
|---------------------|---|
| <b>ADN</b>          | Ácido desoxirribonucleico                   |
| <b>ATCC</b>         | <i>American Type Culture Collection</i>     |
| <b>CLSI</b>         | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| <b>CMI</b>          | Concentración mínima inhibitoria            |
| <b>dNTP's</b>       | Desoxirribonucleótidos                      |
| <b><i>et al</i></b> | Y colaboradores                             |
| <b>g</b>            | Gramos                                      |
| <b>h</b>            | Horas                                       |
| <b>kb</b>           | Kilobases                                   |
| <b>L</b>            | Litros                                      |
| <b>M</b>            | Concentración molar                         |
| <b>mg</b>           | Miligramos                                  |
| <b>min</b>          | Minutos                                     |
| <b>mL</b>           | Mililitros                                  |
| <b>mM</b>           | Concentración milimolar                     |
| <b>nm</b>           | Nanometros                                  |
| <b>pb</b>           | Pares de bases                              |
| <b>PCR</b>          | Reacción en cadena de la polimerasa         |
| <b>PM</b>           | Peso molecular                              |
| <b>pMol</b>         | Concentración en picomoles                  |
| <b>rpm</b>          | Revoluciones por minuto                     |
| <b>s</b>            | Segundos                                    |
| <b>TBE</b>          | Tris, ácido bórico, EDTA                    |
| <b>TSB</b>          | Caldo soya tripticaseína                    |
| <b>UFC</b>          | Unidades formadoras de colonias             |
| <b>UV</b>           | Ultravioleta                                |
| <b>V</b>            | Voltios                                     |
| <b>µg</b>           | Microgramos                                 |
| <b>µL</b>           | Microlitros                                 |

## RESUMEN

*Stenotrophomonas maltophilia* es un patógeno oportunista y multifármacorresistente, aislado principalmente en el medio ambiental y que ha adquirido gran importancia en el ámbito nosocomial en los últimos años, ya que se ha asociado con altas tasas de mortalidad. Se ha demostrado que esta bacteria contiene un amplio repertorio de determinantes relacionados con su resistencia a antibióticos. Entre los mejor estudiados están los sistemas de bombas de eflujo contra diversos antibióticos, la presencia de enzimas inactivadoras de aminoglucósidos, genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas, así como genes que le confieren resistencia a sulfonamidas, entre otros. El objetivo de este trabajo fue determinar los mecanismos de resistencia a antimicrobianos en aislamientos clínicos de *S. maltophilia* recolectados en dos hospitales de tercer nivel en México. Los aislamientos fueron recolectados en un periodo de agosto 2013 a agosto 2015. Se identificaron mediante pruebas bioquímicas y genotípicas. Se seleccionaron un total de 126 aislamientos para el análisis del patrón de susceptibilidad, la determinación de la presencia de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3*, la determinación de la producción de biopelícula y la expresión de bombas de eflujo, SmeABC y SmeDEF. Un total de 126 aislamientos fueron identificados como *S. maltophilia* mediante PCR. El 22.2% de los 126 aislamientos previamente seleccionados presentaron resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SXT). Solo el 1.6% de los aislamientos presentaron el gen *sul1*, el 0.8% el gen *sul2*, mientras que para *sul3* ninguno de los aislamientos analizados amplificó. El 30.1% (n=38) de los aislamientos sobreexpresó la bomba de eflujo SmeABC, mientras que 26.1% (n=33) sobreexpresó la bomba SmeDEF. Respecto a la producción de biopelícula, el 95.2% (n=120) de los aislamientos fueron productores de biopelícula, mientras que el 4.8% (n=6) fueron clasificados como no productores. Dentro de los aislamientos productores, el 7.9% (n=10) fueron clasificados como productores débiles, el 27% (n=34) como moderados y el 60.3% (n=76) como productores fuertes. Los aislamientos de *S. maltophilia* presentaron una resistencia alta al TMP-SXT, la cual no se asoció con la presencia de los genes *sul*. La sobreexpresión de la bomba de eflujo SmeABC fue asociada con la resistencia a gentamicina, cloranfenicol, levofloxacina y TMP-SXT. Los aislamientos de *S. maltophilia* mostraron una alta producción de biopelícula.

## ABSTRACT

*Stenotrophomonas maltophilia* is a multidrug-resistant opportunistic pathogen, often recovered from the environment. It is considered an opportunistic pathogen causing an increasing number of nosocomial infections. Infections by this bacterium have been associated with significant morbidity and mortality, especially in immunocompromised patients. *S. maltophilia* is intrinsically resistant to a variety of structurally-unrelated antimicrobial agents, which difficult the treatment of these infections. Intrinsic resistance may be due to the presence of the multidrug efflux pumps, aminoglycoside modifying enzymes or the heterogeneous production of metallo- $\beta$ -lactamase, which have contributed to the multidrug-resistant phenotype displayed by this pathogen. To determinate the mechanisms of antimicrobial resistance of clinical isolates of *S. maltophilia* collected in 2 hospitals of tertiary care in Mexico. Isolates were collected from patients from august 2013 to august 2015; the isolates collected were identified by phenotypic and genotypic methods. In total, 126 *S. maltophilia* strains were selected. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of 11 antimicrobial agents were determined by broth microdilution method. The presence of *sul1*, *sul2* and *sul3* genes were detected by PCR. Biofilm formation was assessed with crystal violet staining. Additionally, real-time PCR analysis was performed to evaluate the expression of the SmeABC and SmeDEF efflux pumps. A total of 126 *S. maltophilia* isolates were identified. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SXT) was 22.2%. Among the 126 clinical isolates, *sul1* was detected in 2 isolates (1.6%) and *sul2* gene was detected in 1 isolate (0.8%). *sul3* was not detected. Also, 30.1% (n=38) of the clinical isolates overexpressed SmeABC, whereas 26.1% (n=33) overexpressed the SmeDEF efflux pump. Moreover, 24.6% (n=31) overexpressed both efflux pumps. Regarding the biofilm production, the 95.2% (n=120) of the isolates were biofilm producers whereas 4.8% (n=6) were classified as non-producers. Among the biofilm producers, 7.9% (n=10) were weak, 27% (n=34) moderate and 60.3% (n=76) were strong biofilm producers. *S. maltophilia* isolates presented moderate antimicrobial resistance, including high TMP-SXT resistance, which was not associated with the presence of *sul* genes. Overexpression of the efflux pump SmeABC was associated with higher resistance to gentamicin, chloramphenicol, levofloxacin and TMP-SXT. *S. maltophilia* isolates showed high biofilm production.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Stenotrophomonas maltophilia* es un bacilo Gram negativo, no fermentador, aerobio obligado, móvil y flagelado (Brooke 2012), cuyo hábitat principal es el acuático, aunque también se encuentra en suelo, plantas y animales. Actualmente se le considera un patógeno nosocomial emergente debido a la multifármacorresistencia que presentan los aislamientos clínicos de este microorganismo. Aunque *S. maltophilia* se considera como un patógeno nosocomial, también se han reportado casos de adquisición extra-hospitalaria (Heath y Currie 1995; Denton y Kerr 1998).

El riesgo de infección por *S. maltophilia* depende en gran medida del estado inmunológico del paciente, ya que afecta especialmente a pacientes inmunosuprimidos (Denton y Kerr 1998); de la presencia de una enfermedad crónica respiratoria; del uso previo de antibióticos; de la presencia de dispositivos permanentes; del tiempo de estancia en el hospital; entre otros (Brooke 2012) y deben ser aspectos a considerar al momento de seleccionar un tratamiento. Este microorganismo se ha asociado de manera importante con tasas de mortalidad que van desde un 14-69% en pacientes con bacteriemia (Wang *et al.* 1992; Arpi *et al.* 1994; Brooke 2012).

*S. maltophilia* posee numerosos factores de virulencia, entre los más importantes se destacan: múltiples sistemas de expulsión activa o también llamados bombas de eflujo que provocan cambios en la permeabilidad de la membrana externa (Berg y Martinez 2015); la capacidad de producción de una gama de enzimas extracelulares, como lo son, DNasas, RNasas, lipasas, proteasas (Denton y Kerr 1998); factores involucrados en la adherencia a numerosas superficies, relacionados con la capacidad de formación de biopelícula; y genes involucrados en la resistencia a antimicrobianos (Toleman *et al.* 2007; Brooke 2012).

Estos mecanismos de resistencia son adquiridos por la transferencia horizontal de elementos genéticos a través de plásmidos, transposones, integrones, regiones comunes

para elementos de inserción (ISCR) y mediante la producción de biopelículas (Brooke 2012).

Debido a la amplia gama de las manifestaciones clínicas que se asocian a infecciones por *S. maltophilia* en el medio nosocomial, en el presente trabajo se recolectaron aislamientos clínicos de *S. maltophilia* provenientes de diferentes especímenes, se determinó la resistencia fenotípica a los antimicrobianos y los mecanismos involucrados (presencia de genes asociados a resistencia y expresión de bombas de eflujo) y la producción de biopelícula de los aislamientos.

En México, solo existe un estudio epidemiológico que demuestra las frecuencias de resistencia a los principales antimicrobianos, así como caracterización de los factores involucrados en la patogenicidad de este microorganismo (Flores-Treviño *et al.* 2014), por lo cual el cumplimiento de los objetivos y el análisis de los resultados obtenidos, permitirá contribuir con los estudios epidemiológicos para ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia presentes en *Stenotrophomonas maltophilia*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

*Stenotrophomonas maltophilia* es un patógeno oportunista multifarmacorresistente (MFR) que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentra como uno de los principales agentes patógenos resistentes a los antimicrobianos en los hospitales de todo el mundo (OMS, 2000; Brooke, 2014). Este microorganismo de origen medioambiental, es más comúnmente asociado con infecciones respiratorias en los seres humanos (Brooke 2012). Sin embargo, el espectro de los síndromes clínicos asociados con *S. maltophilia* continúa expandiéndose (Denton y Kerr 1998). *S. maltophilia* ha adquirido importancia en la última década como un patógeno asociado con tasas de mortalidad significativas en ciertas poblaciones de pacientes (Denton y Kerr 1998) ya que posee resistencia intrínseca a un amplio número de antimicrobianos pero también puede adquirir resistencia a través de múltiples mecanismos moleculares (Brooke 2014).

### 2.2 Historia y taxonomía de *Stenotrophomonas maltophilia*

El género *Stenotrophomonas* fue propuesto por primera vez en 1993 por Palleroni y Bradbury (Palleroni y Bradbury 1993), designación actualmente aceptada y que deriva de las palabras griegas *Stenos*: estrecho; *Trophos*: aquel que se alimenta; *Monas*: una unidad; *Malt*: del inglés maltosa y *Philos*: amigo (Denton y Kerr 1998).

*S. maltophilia* se aisló por primera vez en 1943 por J.L. Edwards, de una muestra de líquido pleural y se denominó *Bacterium bookeri*. El primer aislamiento reconocido de una cepa de este microorganismo se llevó a cabo en 1958 por Rudolph Hugh, de un hisopado de la orofaringe de un paciente con carcinoma oral y se le denominó *Pseudomonas maltophilia* (Denton y Kerr 1998). Posteriormente, Hugh y Ryschenkow, reclasificaron a la “*Bacterium bookeri*” aislada por Edwards, como *P. maltophilia* (Hugh y Ryschenkow 1961). Estudios taxonómicos posteriores realizados en 1983, permitieron el cambio de nombre de *Pseudomonas maltophilia* a *Xanthomonas maltophilia* (Swings *et al.* 1983) y finalmente en el año de 1993, tras un largo período de situación taxonómica incierta, este bacilo fue reclasificado como *Stenotrophomonas maltophilia* (Palleroni y



Bradbury 1993). Actualmente se reconoce que este género es genética y fenotípicamente heterogéneo y abarcan doce especies reconocidas (Cerezer *et al.* 2014).

### 2.3 Características microbiológicas

*S. maltophilia* es un bacilo Gram negativo aerobio estricto no esporulado, de morfología recta o inclusive ligeramente curvada, con una longitud de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  y un ancho de 0.4 a 0.7  $\mu\text{m}$  (Denton y Kerr 1998). Presenta movilidad debido a unos pocos flagelos polares multitrícos. Crece en forma rápida a una temperatura óptima de 35°C, sin embargo, su crecimiento se ve inhibido a temperaturas inferiores a 5 °C o superiores a 40 °C. En cultivo se observan colonias rugosas de 3-5 mm de diámetro, no fermentadoras, generalmente no hemolíticas, brillantes y de color blanco a amarillento; con las características de tornar las colonias color amarillo en MacConkey y café verdoso en agar sangre (Mahdi *et al.* 2014). *S. maltophilia* es catalasa, DNasa y lisina descarboxilasa positivos; suele ser oxidada e indol negativos; además reducen nitratos, pero estos no son usados como fuente de nitrógeno.

### 2.4 Factores de virulencia y patogénesis

Los factores de virulencia de *S. maltophilia* aún no son bien conocidos. La dificultad para diferenciar entre una colonización y una infección por este patógeno, ha llevado a creer que este microorganismo tiene una limitada patogenicidad. Esta afirmación se vio reforzada en los primeros estudios realizados de *S. maltophilia* por el hecho de que los aislamientos no siempre eran relacionados con una evolución negativa del paciente; por ello se sugirió que *S. maltophilia* solo actuaba de manera sinérgica con otros microorganismos (Gardner *et al.* 1970).

*S. maltophilia* posee un sistema de señalización célula-célula llamado “*Quorum System*” (QS), que está mediado por el sistema de Factor de Señal Difusible (DSF, por sus siglas en inglés), el cual le permite a las bacterias sincronizar determinados comportamientos en una escala poblacional (Ryan *et al.* 2009; Huedo *et al.* 2014). Las funciones específicas reguladas por el sistema de DSF-QS dependen de la especie, pero se ha sugerido que controla varios fenotipos relacionados con la virulencia (Alavi *et al.* 2013). Estudios han demostrado que las proteasas, sideróforos y la formación de

biopelículas son reguladas por este sistema (Berg y Martinez 2015). En el caso de *S. maltophilia*, poco se sabe acerca de los mecanismos de regulación implicados, pero se ha demostrado que la interrupción de la señalización del DSF tiene un efecto drástico, ya que, mutantes para este sistema, muestran motilidad reducida, una reducción de la producción de exoproteasas, LPS alterados y una tolerancia reducida a una serie de antibióticos y a metales pesados (Alavi *et al.* 2013).

#### **2.4.1 Producción de enzimas**

Se ha relacionado la patogenicidad de *S. maltophilia* con la expresión de determinados factores, como la hemolisina; la disminución de la estimulación de neutrófilos (Podschun *et al.* 2000); y la producción de algunas enzimas extracelulares, como DNasas, RNasas, fibrinolisin, lipasas, hialuronidasas, proteasas, fibrinolisin y elastasas, las cuales podrían jugar un importante rol en la patogénesis de este microorganismo (Passerini de Rossi *et al.* 2007).

#### **2.4.2 Fimbrias**

La adherencia a las células epiteliales posee un papel central en la iniciación de la colonización o invasión de los tejidos del huésped por muchas bacterias (Finlay y Falkow 1997). Este evento es a menudo mediado por estructuras fibrilares llamados fimbrias o pili compuesto de varios miles de fimbrina monomérica o subunidades de pilina (Schembri *et al.* 2000). En muchas especies bacterianas, las mutantes con defectos en la producción de fimbrias son menos virulentas, probablemente como resultado de la falta de interacción eficiente de las bacterias con las células epiteliales. La presencia de anticuerpos contra fimbrias en pacientes es un marcador para la infección. Estas son las razones por las que, en parte, las fimbrias son vistos como objetivos importantes para el desarrollo de vacunas y diagnóstico (Schembri *et al.* 2000; de Oliveira-Garcia *et al.* 2003).

En cepas clínicas de *S. maltophilia* se han caracterizado las fimbrias tipo 1 (SMF-1); estas se componen de una subunidad de fimbrina de 17 kDa que comparte similitudes significativas con las secuencias de los extremos N-terminales de los aminoácidos de varias adhesinas fimbriales encontrados en cepas patógenas de *Escherichia coli*. Se ha demostrado que la adherencia y la formación de biopelículas sobre superficies de *S.*

*maltophilia* fueron inhibidas por la presencia de anticuerpos anti-SMF-1, lo que implica que estas fimbrias facilitan la interacción entre la superficie de *S. maltophilia* y la superficie de la célula huésped. Estudios realizados sugieren que las fimbrias SMF-1 están involucrados en hemaglutinación, la formación de biopelículas y la adhesión a las células de mamífero en cultivo (de Oliveira-García *et al.* 2003).

#### **2.4.3 Flagelos**

Los flagelos son estructuras altamente inmunogénicas, que se conservan entre los aislamientos clínicos de *S. maltophilia* y que se han reportado no solo como mediadores en la adherencia, sino también como factores quimiotácticos involucrados en la formación de biopelículas (de Oliveira-García *et al.* 2002; Waters *et al.* 2007). Se ha demostrado que las células de *S. maltophilia* pre-expuestas a antiflejelina disminuyen su capacidad de adhesión a las mucosas (Zgair y Chhibber 2011). Por ello, se sugiere que estas estructuras juegan un rol importante, aunque no determinante para la colonización por *S. maltophilia*.

#### **2.4.4 Lipopolisacáridos**

*S. maltophilia* posee lipopolisacáridos (LPS) que contienen lípido A, lipopolisacárido “core”, y antígeno O (Neal y Wilkinson 1982). Se ha reportado que los LPS cargados influyen en la adhesión celular bacteriana a las superficies, ya que a pH fisiológico *S. maltophilia* posee una carga superficial positiva debida a la ausencia de proteínas de la membrana externa, y esto combinado con LPS no cargados resultó en un aumento de la capacidad de *S. maltophilia* de adherirse al teflón y al vidrio, los cuales posee cargas negativas en su superficie (Jucker *et al.* 1996). La integridad del LPS es importante para la colonización, ya que las alteraciones en LPS pueden cambiar la susceptibilidad de la célula bacteriana a determinados compuestos antimicrobianos, por ejemplo, a péptidos catiónicos y aminoglucósidos y, por tanto, la patogenicidad de este microorganismo.

#### **2.4.5 Biopelícula**

Una biopelícula es una población de microorganismos asociada a una superficie y embebida en una matriz de polímeros extracelulares, el cual puede estar formado por una

sola especie o por múltiples especies de microorganismos (Olson *et al.* 2002).

En *S. maltophilia* (tanto de origen clínico como ambiental), una característica importante, es su capacidad para formar biopelículas sobre superficies como teflón, vidrio y plásticos y en los tejidos del huésped, lo que se considera una propiedad importante de las bacterias comúnmente implicadas en la colonización. La adhesión y el posterior desarrollo de biopelículas en estas diferentes superficies se ven afectados tanto por las propiedades fisicoquímicas de la célula bacteriana (por ejemplo, la presencia de proteínas externas de membrana y LPS) y las superficies a las que se adhiere (Brooke 2012). Se ha demostrado que la motilidad y la quimiotaxis flagelo-dependientes son factores importantes en la formación de biopelículas (Pratt y Kolter 1998).

Los factores ambientales que pueden influir en la formación de las biopelículas de *S. maltophilia* incluyen las concentraciones de fosfato y de cloruro, pH, temperatura, condiciones anaeróbicas o aeróbicas, y la presencia de iones de cobre y plata.

Este patógeno también puede formar biopelículas sobre superficies húmedas que hacen contacto directo o indirecto con los pacientes, incluidos los sistemas de agua, tubos respiratorios, tubos de succión y líneas de agua de la unidad dental, catéteres, líneas intravenosas (IV), equipos de diálisis, entre otros. Se ha demostrado que el nivel de producción de biopelícula fue mayor en condiciones aeróbicas y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 6% que el nivel de la producción en condiciones anaeróbicas, y a un pH óptimo de 5.5 (Brooke 2012).

Además, se han reportado diferencias en la susceptibilidad antimicrobiana de *S. maltophilia* en presencia de biopelículas en comparación con la susceptibilidad presentada por células planctónicas (Wu *et al.* 2013; Brooke 2014). Los antimicrobianos que presentan mejor efecto *in vitro* sobre la biopelícula de *S. maltophilia* son las fluoroquinolonas y la azitromicina, solas o en combinación. Mientras que antimicrobianos como la ceftazidima y el SXT no ejercen una actividad importante sobre la biomasa que compone la biopelícula de este patógeno (Di Bonaventura *et al.* 2003; Wang *et al.* 2016).

Los mecanismos moleculares relacionados con la formación de la biopelícula en *S. maltophilia* no han sido ampliamente estudiados, sin embargo, estudios recientes demostraron que la presencia de mutaciones en los genes *rmlA* y *rpfF* (que codifican para una transferasa involucrada en la formación de la pared bacteriana y para un factor de

señal difusible, respectivamente), disminuyen su formación. Por otro lado, el gen *spgM*, que codifica una enzima bifuncional con actividades fosfoglucomutasa y fosfomanomutasa, es posible que participe de manera importante en la formación de la misma. Sin embargo, aún no está demostrado qué mutación entre los tres genes produce los cambios más significativos involucrados en la producción de la biopelícula de *S. maltophilia* (Zhou *et al.* 2014). El único estudio previo realizado en México sobre la producción de biopelícula de este patógeno, demostró que todos los aislamientos analizados fueron productores de biopelícula y que aproximadamente el 50% fueron clasificados como productores débiles (Flores-Treviño *et al.* 2014).

## 2.5 Importancia clínica

*Stenotrophomonas maltophilia* se consideraba un organismo inusual aislado a partir de muestras clínicas; sin embargo, la frecuencia de los aislamientos de este microorganismo va cada vez en aumento, sobre todo en la población de pacientes inmunocomprometidos (Brooke 2012).

Las infecciones más comúnmente asociadas a este microorganismo son aquellas que se presentan en el tracto respiratorio, particularmente a neumonías asociadas a ventilador (NAV) así como las exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Además, es agente causal de bacteriemia, sepsis biliar, infecciones de huesos y articulaciones, del tracto urinario y de tejidos blandos, endoftalmitis, infecciones oculares, endocarditis y meningitis.

Durante las infecciones crónicas y asociadas a dispositivos, la frecuencia de infección por *S. maltophilia* va de 8 a 28% en los pacientes que reciben ventilación mecánica (VM), teniendo una tasa de mortalidad que oscila desde 24 hasta 50%, y que en algunos casos puede alcanzar un 76% (Chastre y Fagon 2002). Previamente se determinó que tiempos de ventilación mecánica prolongada aumentan significativamente la tasa de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Nseir *et al.* 2006).

Estudios posteriores realizados en un periodo de 2007-2011, indicaron que *S. maltophilia* fue el tercer microorganismo más frecuentemente aislado, representando un 20.27% de los aislamientos totales en pacientes con NAV en la UCI. En pacientes con fibrosis quística (FQ), se ha destacado la importancia de las infecciones por *S. maltophilia*,

ya que según datos del Registro Americano de Pacientes con FQ, la prevalencia de este patógeno en el año 2001 era de 9.6%, constituyendo el cuarto patógeno colonizante más frecuente (Cystic Fibrosis Foundation, 2002). Además este microorganismo es un patógeno importante en los pacientes con cáncer, particularmente pacientes con cáncer de pulmón obstructivo (Brooke 2012).

## 2.6 Epidemiología

*S. maltophilia* es un patógeno nosocomial emergente y el único miembro del género *Stenotrophomonas* que infecta a humanos (Chawla *et al.* 2014). Se ha ubicado a *S. maltophilia* como el tercer bacilo, Gram negativo y no fermentador más comúnmente aislado en el medio nosocomial (Crossman *et al.* 2008); sin embargo, también se han reportado casos de infecciones por este microorganismo adquiridos en la comunidad (Brooke 2012). En las últimas décadas, este microorganismo se ha aislado en distintos medios, regiones geográficas y en una gran variedad de superficies y objetos hospitalarios, como lo son: agua destilada, soluciones desinfectantes, jabones, entre otros (Denton y Kerr 1998; Zanetti *et al.* 2009).

Los datos del programa SENTRY durante el periodo de 1997 a 2008 revelaron una tasa de 3.1% de recuperación de *S. maltophilia* en pacientes hospitalizados con neumonía desde 2004 de 2008, y tasas de recuperación regional de este patógeno de 3.3% para los Estados Unidos, 3.2% para Europa y el 2.3% para América Latina (Jones 2010). En 2012, el Programa para el Estudio y Monitoreo de Tendencias de Resistencia Antimicrobiana (SMART) informó que *S. maltophilia* fue uno de los cuatro principales patógenos asociados con infecciones intraabdominales en la región de Asia-Pacífico (Australia, China, Hong Kong, Malasia, Nueva Zelanda, el Filipinas, Singapur, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia y Vietnam), mientras que en este mismo año el programa de vigilancia antimicrobiano SENTRY, reportó que *S. maltophilia* es uno de los 10 principales patógenos causantes de neumonía en los pacientes en América Latina, en los centros médicos de Brasil, Argentina, México y Chile (Brooke 2014). En pacientes con FQ se estimó una prevalencia de *S. maltophilia* del 28.6% (Burns *et al.* 1998).

La habilidad de *S. maltophilia* de sobrevivir y persistir en superficies inertes probablemente asociada a la producción de biopelícula, puede tener un papel importante

en la capacidad de ocasionar infecciones nosocomiales y brotes (Vila y Marco 2010). Se ha reportado que las manos de los trabajadores de la salud actúan como medio de transporte durante los brotes nosocomiales de infecciones por *S. maltophilia* (Villarino *et al.* 1992). Además, se ha encontrado a este microorganismo en jabones, grifos, entre otros, como las fuentes de infección (Labarca *et al.* 2000).

## **2.7 Factores de riesgo**

Los principales factores de riesgo de infección por este microorganismo en pacientes hospitalizados son la inmunodepresión de diferente naturaleza y enfermedades previas subyacentes, como EPOC, enfermedades cardiovasculares, trasplantes, diálisis, VIH, diabetes mellitus, drogadicción, tabaquismo, entre otros (Julve *et al.* 1998). Un factor de riesgo a destacar asociado con la adquisición de este patógeno es la presencia de neoplasias, principalmente leucemias agudas y carcinoma de mama. Por otro lado, los factores de riesgo extrínsecos que se han sido mejor descritos son la presencia de catéteres vasculares, la ventilación asistida o traqueotomía, las técnicas diagnósticas invasoras, la hospitalización prolongada o estancia en UCI, el uso de equipo en contacto con el tracto respiratorio (nebulizadores, por ejemplo), la quimioterapia citotóxica, los corticosteroides y la exposición previa a antibioticoterapia de amplio espectro.

## **2.8 Transmisión**

No se conoce exactamente su modo de transmisión, aunque es probable que la adquisición del patógeno se realice directamente a través de reservorios ambientales. *S. maltophilia* se ha aislado en pescado, carne cruda de vaca, leche de oveja, heces de conejo, lagartijas y del tracto gastrointestinal de los animales de laboratorio (Denton y Kerr 1998). *S. maltophilia* se ha aislado de varias fuentes, incluyendo tubos de succión del sistema de sillas dentales, endoscopios contaminados, y el agua de grifo, todos los cuales presentan las posibles fuentes de exposición de los pacientes. Por el contrario, la transmisión paciente a paciente, es un acontecimiento raro (Berg y Martinez 2015).

Sin embargo, se ha reportado ocasionalmente agrupamiento de casos ocasionados por cepas genotípicamente similares o indistinguibles.

## **2.9 Manifestaciones clínicas asociadas con infecciones por *S. maltophilia***

### **2.9.1 Infecciones en tracto respiratorio**

El tracto respiratorio es el sitio de origen más común de aislamiento de *S. maltophilia* en pacientes hospitalizados, representando un 56 al 69% de los aislamientos de este microorganismo. Las neumonías nosocomiales causadas por *S. maltophilia* se asocian con ventilación mecánica, traqueostomías, la exposición anterior a los antibióticos de amplio espectro, el uso de equipos de tracto respiratorio tales como nebulizadores, y la terapia con polimixina aerosol. Sin embargo, la fuente de contaminación por *S. maltophilia* en estos pacientes es a menudo poco clara (Denton y Kerr 1998).

### **2.9.2 Bacteriemia**

La bacteriemia es una manifestación común de la infección por *S. maltophilia* y parece estar aumentando en frecuencia y aunque a menudo no es posible determinar el portal de entrada, se ha propuesto que puede ser secundaria a una fuente pulmonar, urinaria, o gastrointestinal (Denton y Kerr 1998).

Los factores de riesgo para la bacteriemia causada por *S. maltophilia* incluyen neutropenia, la presencia de un catéter venoso central (CVC), hospitalización prolongada, y la terapia previa con antibióticos de amplio espectro. En los ensayos clínicos no controlados, las tasas de mortalidad asociado de bacteriemia por *S. maltophilia* comprenden un rango de 21%-69%. Sin embargo, muchos pacientes con bacteriemia tienen enfermedades subyacentes significativas. Además, el organismo a menudo se recuperó a partir de cultivos mixtos. Por lo tanto, la proporción de muertes directamente atribuibles a *S. maltophilia* bacteriemia sigue siendo poco clara (Senol *et al.* 2002; Falagas *et al.* 2009).

### **2.9.3 Endocarditis**

La endocarditis por *S. maltophilia* es poco frecuente. Sus principales factores de riesgo son las válvulas protésicas, la adicción activa a drogas por vía parenteral y la presencia de catéteres intravasculares (Gutierrez *et al.* 1996; Candel *et al.* 2002).

El pronóstico de la infección por *S. maltophilia* es variable y está en función de la gravedad de la infección y del estado basal del huésped. Aunque se han registrado



resultados favorables con el tratamiento antimicrobiano, la intervención quirúrgica para reemplazar la válvula infectada puede ser necesaria (Candel *et al.* 2002).

#### **2.9.4 Piel y tejidos blandos**

*S. maltophilia* se ha aislado relativamente de forma frecuente de heridas y otras lesiones cutáneas. Las sepsis en heridas pueden deberse a una lesión accidental. La infección también se puede producir después de un trauma quirúrgico y en los sitios donde las defensas cutáneas han sido dañadas, tales como traqueotomías y los sitios de catéteres vasculares.

Otras manifestaciones de infecciones de tejidos blandos por *S. maltophilia* incluyen celulitis umbilical, bursitis prerrotuliana, infecciones de heridas por quemaduras, arañazos de gato, las heridas de mordeduras humanas, entre otras (Denton y Kerr 1998).

#### **2.9.5 Otras manifestaciones clínicas**

El aislamiento de *S. maltophilia* se realiza con poca frecuencia en muestras de orina, aunque no está considerada una causa frecuente de infección del tracto urinario. Los casos descritos tienen generalmente un origen nosocomial y son secundarios a instrumentalización del tracto genitourinario, cirugía o enfermedades estructurales del mismo (Senol 2004). Con menor frecuencia se han descrito casos de infección intraabdominal, del tracto gastrointestinal y muy escasamente a meningitis e infecciones de huesos y articulaciones (Denton y Kerr 1998).

### **2.10 Tratamiento**

El tratamiento de las infecciones nosocomiales por *S. maltophilia* es difícil debido a la variabilidad genotípica y fenotípica entre las especies de este microorganismo; a los altos niveles de resistencia intrínseca o adquirida a diferentes agentes antimicrobianos; a las pruebas de susceptibilidad poco estandarizados y a sus criterios interpretativos; a la dificultad de transferir en hallazgos *in vitro* a la práctica clínica, dada la falta de ensayos clínicos aleatorios que comparan la eficacia de los agentes antimicrobianos; reducen drásticamente las opciones de los antibióticos disponibles para el tratamiento.

El TMP-SXT sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento de las

infecciones asociadas a *S. maltophilia*, aunque el ácido clavulánico ticarcilina, la minociclina, algunas de las nuevas fluoroquinolonas, y la tigeciclina puede ser agentes útiles (Nicodemo y García 2007). Es importante destacar que si bien se sugiere el uso de ciertos antimicrobianos de primera elección, en la actualidad, no existe una guía estandarizada en todo el mundo para realizar pruebas de este microorganismo contra determinados agentes antimicrobianos (Gülmez y Hasand 2005).

#### **2.10.1 Trimetoprim-sulfametoxazol**

El trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SXT) se debe considerar como elección empírica cuando se sospecha de infecciones por *S. maltophilia* y como tratamiento de elección para las infecciones por este agente probadas mediante cultivo (Nicodemo y García 2007).

#### **2.10.2 Ticarcilina-ácido clavulánico y ácido clavulánico-aztreonam**

En general, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos muestran una baja actividad contra *S. maltophilia*, debido a los mecanismos de resistencia asociados a este patógeno. Las tasas de resistencia de *S. maltophilia* a  $\beta$ -lactámicos como la ampicilina, la amoxicilina, la piperacilina y el aztreonam son invariablemente altas. Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico a veces puede aumentar la susceptibilidad de *S. maltophilia* a dichos agentes (Muñoz *et al.* 1997). La combinación de ácido clavulánico-ticarcilina se ha recomendado como una segunda opción terapéutica, principalmente en el tratamiento de los pacientes que experimentan efectos adversos con el tratamiento con TMP-SXT (Denton y Kerr 1998). Otras combinaciones como ticarcilina-sulbactam, piperacilina-tazobactam, y ampicilina-sulbactam no muestran una buena actividad contra esta bacteria (Nicodemo y García 2007).

#### **2.10.3. Cefalosporinas y carbapenemas**

Las cefalosporinas en general muestran una baja actividad contra *S. maltophilia*, sin embargo, se ha demostrado que cefoperazona, ceftazidima y cefepima ejercen cierta actividad *in vitro* (Nicodemo y García 2007). El riesgo de inducción de resistencia debido a la producción de  $\beta$ -lactamasas y la baja actividad de las  $\beta$ -lactamas, especialmente de

las cefalosporinas, limita su uso empírico en el tratamiento de infecciones por *S. maltophilia* (del Toro *et al.* 2002). Las combinaciones de cefalosporinas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, como el ácido clavulánico-ceftazidima, cefoperazina-sulbactam y ácido clavulánico-cefepima, tienen una eficacia *in vitro* escasa (Nicodemo y García 2007). *Stenotrophomonas maltophilia* es intrínsecamente resistente a los carbapenémicos, por lo que estos antimicrobianos no son efectivos (Howe *et al.* 1997).

#### **2.10.4 Fluoroquinolonas**

Nuevas fluoroquinolonas como clinafloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, y sitafloxacin, mostraron una actividad superior *in vitro* en comparación con quinolonas de primera generación (Nicodemo y García 2007). La tigeciclina y la levofloxacin son dos antimicrobianos que solos o en combinación con otros antimicrobianos parecen ser prometedores para su uso en pacientes con fibrosis quística (Milne y Gould 2012).

#### **2.10.5 Aminoglucósidos**

Los aminoglucósidos muestran poca actividad contra *S. maltophilia* debido a la producción constitutiva de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos; a la resistencia dependiente de temperatura que resulta de los cambios de la membrana externa; y la expresión de los sistemas de bomba de eflujo. La gentamicina, tobramicina y amikacina muestran invariablemente altos niveles de resistencia (Nicodemo y García 2007).

#### **2.10.6 Cloranfenicol y tetraciclinas**

El cloranfenicol muestra cierta actividad *in vitro* frente a *S. maltophilia*, aunque hay diferencias considerables en los perfiles de susceptibilidad. Al igual que las tetraciclinas, la minociclina muestra una alta actividad *in vitro* contra cepas de *S. maltophilia*. La tigeciclina, una glicilciclina, es un compuesto que ha demostrado una buena actividad *in vitro* frente a los aislamientos de *S. maltophilia* (Nicodemo y García 2007).

### 2.10.7 Polimixinas

Las polimixinas tienen una estructura y mecanismo de acción único, apuntando a la membrana celular bacteriana. El anillo del péptido policationico de las polimixinas interactúa con las moléculas aniónicas de los LPS en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desplazando así los cationes de calcio y magnesio que estabilizan las moléculas de LPS. Este proceso resulta en un aumento en la permeabilidad de la envoltura celular, la fuga de contenido celular, y, en consecuencia, la muerte (Newton 1956; Schindler y Osborn 1979). El uso de polimixinas para tratar las infecciones por bacilos Gram negativos, no fermentadores y multirresistentes, ha adquirido cada vez mayor importancia. Sin embargo, existen limitaciones en su uso debido a la escasez de estudios clínicos con estos fármacos y a su toxicidad (Nicodemo y García 1997).

### 2.11 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

La razón principal para el aumento de las infecciones por *S. maltophilia* es la resistencia intrínseca de esta especie a muchos antimicrobianos de primera línea, tales como  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenémicos, enzimas modificadoras de aminoglucósidos (excepto gentamicina), macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol y quinolonas. Por otra parte, los aislamientos de *S. maltophilia* pueden desarrollar rápidamente resistencia a las fluoroquinolonas más nuevas a través de mutaciones y aunque los mecanismos subyacentes no están bien estudiados, es probable que sean el resultado de la sobreproducción intrínseca de bombas de eflujo. Típicamente, la terapia empírica para *S. maltophilia* es TMP- SXT, a la que más del 95% de los aislamientos son sensibles. Sin embargo, la resistencia está aumentando como consecuencia de la propagación de la resistencia y, en muchos pacientes, la terapia de TMP- SXT está contraindicada (Denton y Kerr 1998).

Para otros antimicrobianos, se ha demostrado menos del 25% de susceptibilidad a ticarcilina, la piperacilina y el aztreonam; un 50% de susceptibilidad a la ceftazidima y a la cefepima (Muñoz *et al.* 1997; Weiss *et al.* 2000) y más del 70% de susceptibilidad a levofloxacin (Gould *et al.* 2013). Casi todos los aislamientos resultaron ser resistentes a los carbapenémicos aunque el moxalactam ha mostrado tener un porcentaje de resistencia del 2% (Muñoz *et al.* 1997; Weiss *et al.* 2000).

### **2.11.1 Mecanismos de resistencia inespecíficos a los antimicrobianos**

La baja permeabilidad de *S. maltophilia* ha sido considerada durante mucho tiempo como factor responsable de su fenotipo multifármacorresistente. Estudios realizados en la última década han permitido descubrir que la multifarmacorresistencia asociada a la membrana externa podría explicarse por alteraciones en la composición de la membrana, por el bajo número de moléculas porinas (Vila y Marco 2010) y por una mayor expresión de las proteínas de membrana externa implicadas en los mecanismos de expulsión activa (Sevillano *et al.* 2001). Numerosos ejemplos de sistemas de flujo de salida que se han caracterizado y se han implicado en la resistencia a los antibióticos en las bacterias Gram negativas y Gram positivas, siendo las bombas mejor caracterizadas SmeABC y SmeDEF (Fernández y Hancock 2012). En particular, la exportación de drogas se ha relacionado con multifármacorresistencia, ya que la mayoría de los sistemas de eflujo pueden transportar múltiples sustratos (Nikaido y Pagès 2012).

#### **2.11.1.1 Membrana externa y sistemas de expulsión activa.**

La susceptibilidad a los antibióticos a menudo se relaciona con la presencia de bombas de expulsión activa, las cuales son estructuras proteicas dependientes de energía, que provocan la salida de los antimicrobianos de la célula (Brooke 2012). Son utilizados por los microorganismos para evitar la acumulación intracelular de compuestos tóxicos, bombeando tales moléculas fuera de la célula en un proceso que no está relacionado con la alteración o la degradación de los fármacos. Estos sistemas se encuentran constituidos por una proteína de unión, un transportador (dependiente de energía) y una porina asociada a la membrana externa (Fernández y Hancock 2012).

De acuerdo a sus características estructurales estos sistemas de expulsión activa se clasifican en 5 familias: cassette de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés), superfamilia del facilitador mayor (MFS), extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE), resistencia pequeña a multifármacos (SMR) y resistencia a división por nodulación (RND). Entre ellos, la familia RND es el principal mediador más eficaz en bacterias Gram negativas que presentan multifármacorresistencia (Wu *et al.* 2016).

La actuación de estos sistemas de bombas de expulsión activa son un factor que

contribuye, de forma cuantitativamente significativa, al fenotipo multifarmacorresistente intrínseco o adquirido en *S. maltophilia* (Alonso y Martinez 1997). Estos sistemas de eflujo se componen de tres proteínas localizadas en la membrana externa (Brooke 2012), el espacio periplásmico y la membrana interna de microorganismos Gram negativos, formando un canal capaz de eliminar hacia el exterior de la bacteria un gran número de sustancias mediante un mecanismo de transporte dependiente de protones. Estos sistemas activos desintoxicantes se denominan SmeM, por sus siglas en inglés *Stenotrophomonas multidrug efflux* (Zhang *et al.* 2000).

En *S. maltophilia* se han identificado 8 bombas de eflujo de expresión constitutiva pertenecientes a la Familia RND, SmeABC, SmeDEF, SmeGH, SmeIJK, SmeMN, SmeOP, SmeVWX y SmeYZ (Wu *et al.* 2016); 2 pertenecientes a la superfamilia MFS y 2 casetes de unión a ATP (ABC). En general, los genes que codifican para la porina, para la proteína periplásmica de fusión (MFP) y para la proteína interior, se encuentran en el mismo operón. Además, las bombas de eflujo de MFR son modulados por un regulador de la proteína codificada por un gen localizado río arriba y de forma divergente, transcrita a partir del operón de la bomba de eflujo (Sanchez *et al.* 2009).

Todas las proteínas del flujo de salida de las bombas SmeABC y SmeDEF, que pertenecen a la familia RND, están codificados en el mismo operón. Las funciones de estas bombas de eflujo de resistencia han sido ampliamente caracterizadas. SmeABC está implicado en la resistencia adquirida a  $\beta$ -lactamasas, aminoglucósidos y quinolonas, pero no tiene influencia sobre la resistencia intrínseca y la delección del gen *smec* afecta a la susceptibilidad a varios antimicrobianos, lo que sugiere su posible relación con otras bombas de eflujo. SmeDEF está involucrado tanto en la resistencia intrínseca y adquirida al cloranfenicol, tetraciclinas y quinolonas, así como a la resistencia adquirida a los compuestos no antibióticos como el triclosan, detergentes, solventes orgánicos (Sanchez *et al.* 2009). Por otro lado, ni los  $\beta$ -lactámicos ni los aminoglucósidos parecen ser buenos sustratos para este sistema (Zhang *et al.* 2001). SmeOP tiene como principales sustratos al ácido nalidíxico, doxiciclinas, aminoglucósidos y macrólidos (Wu *et al.* 2016); SmeVWX está implicada principalmente en la resistencia a quinolonas (Garcia-Leon *et al.* 2015); mientras que SmeIJK y SmeYZ se han implicado con la resistencia en *S. maltophilia* a TMP-SXT y aminoglucósidos, principalmente (Wu *et al.* 2016).

Debe tenerse en cuenta que las bombas de eflujo son un factor importante en la resistencia contra los antimicrobianos, sobre todo en aquellos microorganismos que presentan una baja permeabilidad dada por la ausencia de porinas, debido al efecto sinérgico entre estas dos estrategias de resistencia (Fernández y Hancock 2012).

#### **2.11.1.2 Proteínas de membrana externa.**

Las proteínas de membrana externa (OMP), también llamadas porinas que facilitan la adquisición de nutrientes provenientes del medio externo y forman parte de las bombas de eflujo antes descritas. Estas son proteínas transmembranales que permiten el paso de diversas moléculas; en especial de compuestos hidrofílicos. Hay varias clases de porinas: las porinas que están implicadas en la determinación de la permeabilidad, las porinas que permiten la absorción de sustratos más específicos (por ejemplo, LamB, implicado en la captación de maltosa) y las proteínas de membrana externa reguladas por hierro (PME u OMP), que se acoplan a un sistema de energización de la membrana citoplasmática para permitir la captación específica de complejos de hierro (Fernández y Hancock 2012).

Se ha reportado que la pérdida de estas porinas provoca cambios en la permeabilidad de la membrana, disminuyendo el transporte de los antimicrobianos al interior de la célula, lo que favorece a su resistencia a una gran diversidad de antimicrobianos (Gordon y Wareham 2010).

#### **2.11.2 Mecanismos de resistencia asociados a $\beta$ -lactamasas**

*S. maltophilia* posee dos  $\beta$ -lactamasas inducibles: L1, una metaloenzima dependiente de  $Zn^{2+}$  con la capacidad de hidrolizar casi todas las clases de  $\beta$ -lactámicos (aunque no monobactam); y L2, una cefalosporinasa con un sitio activo para la serina. La expresión de ambas enzimas está regulada por *ampR* (un tipo de regulador *LysR* situado río arriba del gen L2), e inducido por la presencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *ampR* actúa como un represor débil del gen L2 en ausencia del inductor, y como un activador en su presencia. Con respecto a L1, *ampR* se requiere tanto para la expresión basal como para la inducida. La expresión de estas enzimas en *S. maltophilia* también está sujeto a una red compleja regulación. La supresión del operón AMPN-AMPG, que codifica un transportador de permeasa, impide la inducción de  $\beta$ -lactamasas (Avison *et al.* 2001; Huang *et al.* 2010).

### **2.11.3 Mecanismos de resistencia asociados a TMP-SXT**

Recientemente, se ha estudiado la presencia de integrones clase I dentro de transposones, los cuales pueden ser transferidos a plásmidos o al DNA cromosómico de *S. maltophilia* mediante eventos de transposición y los cuales contienen diferentes conjuntos de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos; destacando en importancia el gen *sul*, que confiere resistencia a las sulfonamidas. Aunque *sul1* es el gen de resistencia a sulfametoxazol predominante, la presencia de otro gen, *sul2*, se ha estudiado en cepas resistentes a TMP-SXT; en la mayoría de los casos este gen se localizó en plásmidos grandes ( $\approx 120$  kb). Se ha reportado que los elementos de regiones comunes de secuencias de inserción ISCR y los genes *dfrA*, localizados en los casetes genéticos de los integrones de clase I, también contribuyen a la baja susceptibilidad de *S. maltophilia* al TMP-SXT (Toleman *et al.* 2007; Hu *et al.* 2011).

Sin embargo, aunque nunca se ha demostrado que el gen *sul1* presente actividad en la síntesis de ácido fólico, se puede especular que la presencia de este gen podría contribuir a un aumento en la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) (Barbolla *et al.* 2004) inhibiendo la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (sulfametoxazol) y de la enzima dihidrofolato reductasa (trimetoprim), las cuales son enzimas necesarias en la síntesis de ácido fólico, útil en el desarrollo bacteriano (Mosquito *et al.* 2012). En conjunto, esto indica que la presión selectiva a antibióticos reciente en entornos clínicos, es la selección de cepas que contienen genes *sul* adquiridos por transferencia horizontal (Sanchez *et al.* 2009).

### **2.11.4 Mecanismos de resistencia asociados a aminoglucósidos**

Se ha relacionado la 6'-N-acetiltransferasa de tipo I, una aminoglicosidasa de 16 kDa, con la resistencia intrínseca de *S. maltophilia* a la amikacina, netilmicina y tobramicina y, en menor medida, a la gentamicina (Lambert *et al.* 1999).

### **2.11.5 Mecanismos de resistencia asociados a macrólidos**

Este mecanismo de resistencia se da como el resultado de transferencia a partir de bacterias Gram positivas de un grupo de genes que codifican para una enzima, la



macrólido 2'-fosfotransferasa II, y que se han relacionado con la resistencia a antibióticos y a metales pesados (Alonso *et al.* 2000).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Stenotrophomonas maltophilia* es un microorganismo multifármacorresistente que a nivel intrahospitalario causa principalmente neumonías y bacteriemias. En México existen pocos estudios sobre los mecanismos de resistencia a antimicrobianos y los factores de virulencia de aislamientos clínicos de *S. maltophilia*

#### **4. HIPÓTESIS**

Los aislamientos de *S. maltophilia* presentan genes asociados a resistencia, altos niveles de expresión de bombas de eflujo y alta producción de biopelícula que contribuyen a su multifármacorresistencia.

## 5. OBJETIVO

### 5.1 Objetivo general

Determinar los mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana y la presencia de biopelícula de aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* de dos hospitales de tercer nivel en México.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Recolectar e identificar a nivel de especie aislamientos clínicos de *S. maltophilia* de dos hospitales de tercer nivel en México.
- 2) Determinar el patrón de susceptibilidad de *S. maltophilia* a los antimicrobianos.
- 3) Detectar la presencia de genes asociados a resistencia contra Trimetoprim-sulfametoxazol en los aislamientos de *S. maltophilia*.
- 4) Evaluar la expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF en los aislamientos de *S. maltophilia*.
- 5) Determinar la producción de biopelícula de los aislamientos de *S. maltophilia*.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Obtención de los aislamientos.**

Se colectaron aislamientos de *Stenotrophomonas maltophilia* provenientes de varios especímenes clínicos, los cuales fueron previamente aislados en el Laboratorio Central del Hospital Universitario “José Eleuterio González” y el Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”. Estos aislamientos fueron seleccionados de pacientes mayores de 18 años en un periodo comprendido de agosto 2013 a agosto 2015. Los aislamientos se conservaron en congelación a -70°C en caldo Brucella con glicerol al 15% hasta su uso posterior.

### **6.2 Identificación bioquímica de los aislamientos.**

Los aislamientos previamente recolectados fueron identificados a nivel de especie usando los paneles de Sensititre (TREK Diagnostic Systems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **6.3 Identificación molecular de los aislamientos.**

Para la identificación molecular se realizó la extracción del DNA genómico por el método de lisis térmica para posteriormente realizar la identificación a nivel de especie por medio de PCR.

#### **6.3.1 Extracción de DNA genómico por lisis térmica.**

Los aislamientos fueron sembrados en agar sangre e incubados a 35°C ± 2°C durante 18 h (Incubadora *Lab Cli-Micro*, modelo 0166). Se tomaron de 3 a 4 colonias y se resuspendieron en viales de 1.5 mL con 100 µL de agua miliQ estéril. Se mezclaron en un agitador tipo vórtex (*Deluxe*, modelo S8220) hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente los viales fueron calentados a una temperatura de 95°C en un baño seco (*Labnet International*, modelo D1200) durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, los viales se centrifugaron por 5 minutos a 13,500 rpm (*Iec Microelite* modelo RF). Se colectaron los sobrenadantes en viales de 0.5 mL y finalmente se congelaron a -20°C hasta su uso posterior.

### 6.3.2 Identificación de especie mediante PCR

La identificación de la especie fue confirmada por amplificación de un fragmento de 134 pb del gen 16S de rRNA (Rios-Licea *et al.* 2010) mediante amplificación por PCR (MaxyGene II Thermal Cyclers, Corning Axygen). Las mezclas de reacción contenían 1 x de buffer de PCR, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada primer (Tabla 1), 1 U de AmpliTaq polimerasa (Bioline, USA) y 200 ng de DNA. Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min; seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s; y un paso final de elongación a 72°C por 5 min. La cepa ATCC 13637 de *S. maltophilia* se usó como cepa de referencia. Los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5X, previa tinción con bromuro de etidio a una concentración de 1 mg/mL. Se empleó un marcador de 100-1000 pb (HyperLadder I, Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.).

**Tabla 1.** Primers para amplificación del gen 16S de rRNA (Rios-Licea *et al.* 2010).

| Gen         |         | Primers                     | Producto (pb) |
|-------------|---------|-----------------------------|---------------|
| <i>rRNA</i> | Forward | 5'-GATCCTGGCTCAGAGTGAACG-3' | 134           |
|             | Reverse | 5'-CCCACGACAGAGTAGATTCCG-3' |               |

### 6.4 Susceptibilidad a los antimicrobianos

La determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo por el método de microdilución en caldo utilizando los paneles Sensititre (TREK Diagnostic Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los antimicrobianos que se incluyeron dentro del análisis fueron: amikacina, cefepima, cefotaxima, ceftazidime, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, meropenem y TMP-SXT. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a los criterios establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) para *S. maltophilia* (Tabla 2) y para aquellos agentes evaluados sin criterios específicos, se utilizaron los criterios descritos en el CLSI para las *no Enterobacteriaceae* (Tabla 3).

**Tabla 2.** Criterios de evaluación de *S. maltophilia* contra antimicrobianos (CLSI, 2016).

| Grupo de Reporte  | Agente antimicrobiano      | Criterios de interpretación de la Concentración<br>Mínima Inhibitoria<br>(µg/mL) |             |        |
|---|----------------------------|--|-------------|--------|
|   |                            | S  | I           | R      |
| Combinaciones de inhibidores para β-lactámicos/β-lactamasas |                            |  |             |        |
| B   | Ticarcilina-clavulanato    | ≤16/2  | 32/2 – 64/2 | ≥128/2 |
| Cefemas (Incluyendo cefalosporinas I, II, III y IV)         |                            |  |             |        |
| B   | Ceftazidima                | ≤8   | 16          | ≥32    |
| Tetraciclinas   |                            |  |             |        |
| B   | Minociclina                | ≤4   | 8           | ≥16    |
| Fluoroquinolonas  |                            |  |             |        |
| B   | Levofloxacina              | ≤2   | 4           | ≥8     |
| Inhibidores de la vía de los folatos                        |                            |  |             |        |
| A   | Trimetoprim-sulfametoxazol | ≤2/38  | -           | ≥4/76  |
| Fenicoles   |                            |  |             |        |
| B   | Cloranfenicol              | ≤8   | 16          | ≥32    |

**Tabla 3:** Criterios de evaluación de no-*Enterobacteriaceae* contra los antimicrobianos (CLSI 2016).

| Grupo de Reporte                                    | Agente antimicrobiano | Criterios de interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) |         |     |
|---|-----------------------|--|---------|-----|
|   |                       | S  | I       | R   |
| Cefemas (Incluyendo cefalosporinas I, II, III y IV) |                       |  |         |     |
| B   | Cefepime              | ≤8   | 16      | ≥32 |
| C   | Cefotaxima            | ≤8   | 16 - 32 | ≥64 |
| Carbapenémicos                                      |                       |  |         |     |
| B   | Meropenem             | ≤4   | 8       | ≥16 |
| Aminoglucósidos                                     |                       |  |         |     |
| A   | Gentamicina           | ≤4   | 8       | ≥16 |
| B   | Amikacina             | ≤16  | 32      | ≥64 |

**Tabla 3:** Criterios de evaluación de no-*Enterobacteriaceae* contra los antimicrobianos (CLSI 2016), *continuación*.

| Grupo de Reporte | Agente antimicrobiano | Criterios de interpretación de la Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) |   |    |
|------------------|-----------------------|--|---|----|
|                  |                       | S  | I | R  |
| Fluoroquinolonas |                       |  |   |    |
| B                | Ciprofloxacina        | ≤1   | 2 | ≥4 |
| B                | Levofloxacina         | ≤2   | 4 | ≥8 |

## 6.5 Detección de los elementos genéticos asociados a resistencia antimicrobiana

La presencia de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* se evaluó mediante el uso de primers específicos para cada uno (Instituto de biotecnología, UNAM), enlistados en la Tabla 4 (Toleman *et al.* 2007; Hu *et al.* 2011; Chung *et al.* 2015). El análisis se llevó a cabo mediante PCR punto final (MaxyGene II Thermal Cyclor, Corning Axygen). Las mezclas de reacción contenían 1X de buffer de PCR, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada primer, 1 U de AmpliTaq polimerasa (Bioline USA) y 200 ng de DNA. Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 5 min; seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 50°C por 1 min y extensión a 68°C por 1 min; y un paso final de elongación a 68°C por 5 minutos.

**Tabla 4.** Primers para amplificación de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* (Toleman *et al.* 2007; Hu *et al.* 2011; Chung *et al.* 2015).

| Genes       |         | Primers                                     | Producto (pb) |
|-------------|---------|---|---------------|
| <i>sul1</i> | Forward | 5'- ATG GTG ACG GTG TTC GGC ATT CTG A -3'   | 840           |
|             | Reverse | 5'- CTA GGC ATG ATC TAA CCC TCG GTC T -3'   |               |
| <i>sul2</i> | Forward | 5'- GAA TAA ATC GCT CAT CAT TTT CGG -3'     | 810           |
|             | Reverse | 5'- CGA ATT CTT GCG GTT TCT TTC AGC -3'     |               |
| <i>sul3</i> | Forward | 5'- GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG -3'          | 1007          |
|             | Reverse | 5'- CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA -3' |               |



## **6.6 Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF**

### **6.6.1 Extracción del material genético por lisis térmica**

Los aislamientos fueron sembrados en agar sangre e incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18 h (Incubadora *Lab Cli-Micro*, modelo *0166*). Se tomaron de 3 a 4 colonias y se resuspendieron en viales de 1.5 mL con 100  $\mu\text{L}$  de agua miliQ estéril. Se mezclaron en un agitador tipo vórtex (*Deluxe*, modelo *S8220*) hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente los viales fueron calentados a una temperatura de  $95^{\circ}\text{C}$  en un baño seco (*Labnet International*, modelo *D1200*) durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, los viales se centrifugaron por 5 minutos a 13,500 rpm (*Iec Microelite* modelo *RF*). Se colectaron los sobrenadantes en viales de 0.5 mL.

### **6.6.2 Extracción de RNA total**

Se extrajo el ARN total a partir de los sobrenadantes obtenidos anteriormente por lisis térmica. Para ello se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.6.3 Cuantificación del RNA total**

Se determinó la pureza del ARN total por espectrofotometría (*Beckman Coulter*, modelo DU 800) midiendo la relación de absorbancias a 260/280 y empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

### **6.6.4 RT-PCR**

Las mezclas de la amplificación por qPCR (10  $\mu\text{L}$ ), contenían 1X de 2X SensiFast<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> No-ROX One-Step Mix, 1X Transcriptasa reversa, 1X RiboSafe Inhibidor RNasas (Bioline, USA Inc., Boston MA, E.U.A.), 10 ng/ $\mu\text{L}$  de RNA molde y 400 nM de los primers descritos en la Tabla 5 (Instituto de biotecnología, UNAM).

**Tabla 5.** Primers utilizados para evaluar la expresión de SmeABC y SmeDEF (Cho *et al.* 2012).

| Gen         |         | Primers                             | Tm   | Producto (pb) |
|-------------|---------|-------------------------------------|------|---------------|
| <i>SmeB</i> | Forward | 5'- ACC GCC CAG CTT TCA TAC AG -3'  | 87°C | 110           |
|             | Reverse | 5'- GAC ATG GCC TAC CAG GAA CAG -3' |      |               |
| <i>SmeF</i> | Forward | 5'- TCG TCC AGG CTG ACA TTC AA -3'  | 85°C | 101           |
|             | Reverse | 5'- AAC GCG GAT CGT GAT ATC G -3'   |      |               |
| <i>rDNA</i> | Forward | 5'- GAT CCT GGC TCA GAG TGA ACG -3' | 86°C | 134           |
|             | Reverse | 5'- CCC ACG ACA GAG TAG ATT CCG -3' |      |               |

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador Cepheid SmartCycler II real-time PCR system (Cepheid, Sunnyvale, CA). Para la amplificación se llevó a cabo un paso inicial de retrotranscripción a 94°C por 5 min; seguido de 1 ciclo de activación a 95°C por 2 min; posteriormente se incluyeron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s. Las curvas de calibración para los niveles de expresión de SmeABC, SmeDEF y rDNA se construyeron utilizando los niveles de expresión de estos genes en *S. maltophilia* ATCC 13637; estas curvas estándar se utilizaron como calibradores para normalizar los niveles de expresión relativos de los genes *SmeB* y *SmeF* en aislamientos clínicos (Cho *et al.* 2012). Los resultados finales, se expresaron siguiendo la fórmula siguiente, propuesta por Chang *et al* (Chang *et al.* 2004).

$$n = \frac{\text{Ct}_{\text{SmeB ó SmeF Muestra}}}{\text{Ct}_{\text{rDNA Muestra}}} / \frac{\text{Ct}_{\text{SmeB ó SmeF Calibrador}}}{\text{Ct}_{\text{rDNA Calibrador}}}$$

## 6.7 Formación de biopelícula

La formación de biopelícula se determinó mediante la tinción con cristal violeta como se ha descrito previamente (Di Bonaventura *et al.* 2004; Pompilio *et al.* 2011). Primeramente, se sembraron los aislamientos en agar sangre y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se realizaron inóculos a una turbidez de 1.0 de McFarland con

solución salina; se realizó una dilución 1:100, utilizando 200  $\mu\text{L}$  de TSB y se inocularon 4 pocillos de una placa de microtitulación (Corning and Falcon, MA, EUA), además se añadió en 1 pocillo de cada placa solución de TSB estéril como blanco del ensayo. Después de 24 h de incubación a 37°C, se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a una placa nueva y se midió su absorbancia a 600 nm. Se descartó el sobrenadante de todos los pocillos para después realizar 3 lavados con 250  $\mu\text{L}$  de solución de PBS estéril (pH 7.3) y se dejó secar en una campana de flujo (The Baker Company, modelo EG 4252). Las biopelículas adheridas se tiñeron usando 100  $\mu\text{L}$  de Cristal Violeta modificado por Hucker al 0.5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron 5 lavados con 150  $\mu\text{L}$  de solución de PBS estéril (pH 7.3) y se dejó secar en una campana de flujo (The Baker Company, modelo EG 4252). Las muestras se destiñeron con 150  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial al 33% durante 15 minutos en agitación. Finalmente, se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm.

Los puntos de corte bajo se eligieron de acuerdo con los criterios descritos por Stepanovic *et al.* que incluyen muestras de aproximadamente tres desviaciones estándar por encima de la DO media de los pocillos de la cepa control (Stepanovic *et al.* 2007). La clasificación se llevó a cabo de acuerdo a los siguientes criterios: No productor:  $\text{DO} = \text{DO} \leq \text{DOc}$ ; Débil productor de biopelícula:  $\text{DOc} < \text{OD} \leq 2 \times \text{DOc}$ ; Moderado productor de biopelícula:  $2 \times \text{DO} < \text{DO} \leq 4 \times \text{ODc}$ ; Fuerte productor de biopelícula:  $4 \times \text{ODc} < \text{OD}$ .

## 6.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron usando t-Test (dos colas) y análisis de ANOVA para determinar la correlación para la sobreexpresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF con los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad. Esto se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS 22.0 (IBM Corporation).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamientos clínicos de *S. maltophilia*.

Se seleccionaron aislamientos previamente clasificados como *S. maltophilia* colectados de agosto 2013 a agosto 2015 en el Hospital “Dr. José Eleuterio González” localizado en Monterrey, Nuevo León y el Hospital Civil “Fray Antonio Alcalde” localizado en Guadalajara, Jalisco.

De los 135 aislamientos recolectados, el 4.4% (n=6) se descartó por contaminación del vial primario. El resto de los aislamientos fue identificado con pruebas bioquímicas (Sensititre) y moleculares (PCR). El 97.6% (n=126) de los aislamientos fue identificado como *S. maltophilia* por ambos métodos, por lo que se incluyeron en los posteriores análisis.

El 29% (n=36) de los aislamientos fue obtenido del área de Cuidados Intensivos Adultos (UCIA), el 19% (n=24) provenía del área de Medicina Interna, el 9% (n=12) del área de Cirugía, mientras que el 43% (n=54) fue obtenido de áreas como Urgencias, Ginecología, Traumatología, entre otras.

El 59% (n=74) de los aislamientos provenía de muestras de vías respiratorias superiores, el 14% (n=18) de muestras sanguíneas, el 3% (n=4) de catéteres, mientras que el resto 24% (n=30) se recuperó de especímenes tales como: orina, heridas, abscesos, úlceras, líquido cefalorraquídeo, entre otras.

### 7.2 Susceptibilidad a los antimicrobianos

Los aislamientos de *S. maltophilia* presentaron resistencia alta a meropenem y a cefotaxime, con porcentajes aproximados de 65% y 90%, respectivamente. Para amikacina, cefepime, ceftazidime, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol, los porcentajes de resistencia se encuentran entre un 10-50%. Solo un 3.2% de los aislamientos presentaron resistencia a levofloxacina (Tabla 6). Un aislamiento (0.8%) presentó resistencia a todo el perfil de antimicrobianos probados.

**Tabla 6.** Concentración mínima inhibitoria y perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en aislamientos de *S. maltophilia*.

| Antimicrobiano | CMI <sub>50</sub><br>(µg/mL) | CMI <sub>90</sub><br>(µg/mL) | Resistente<br>n (%) | Intermedio<br>n (%) | Susceptible<br>n (%) |
|----------------|------------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Amikacina      | 32                           | >32                          | 46 (36.5)           | 41(32.5)            | 39 (31)              |
| Cefepime       | 16                           | >16                          | 47 (37.3)           | 30 (23.8)           | 49 (38.9)            |
| Cefotaxima     | >32                          | >32                          | 82 (65)             | 34 (27)             | 10 (8)               |
| Ceftazidime    | >16                          | >16                          | 66 (52.3)           | 15 (12)             | 45 (35.7)            |
| Cloranfenicol  | 16                           | >16                          | 16 (12.7)           | 59 (46.8)           | 51 (40.5)            |
| Ciprofloxacina | 2                            | >2                           | 34 (27)             | 49 (38.9)           | 43 (34.1)            |
| Gentamicina    | 8                            | >8                           | 62 (49.2)           | 21 (16.7)           | 43 (34.1)            |
| Levofloxacina  | ≤2                           | ≤2                           | 4 (3.2)             | 3 (2.4)             | 119 (94.4)           |
| Meropenem      | >8                           | >32                          | 117 (92.8)          | 4 (3.2)             | 5 (4.0)              |
| TMP-SXT        | ≤2                           | >2                           | 28 (22.2)           | NA                  | 98 (77.8)            |

CMI<sub>50</sub>: Concentración mínima para inhibir el 50% de los microorganismos, CMI<sub>90</sub>: Concentración mínima para inhibir el 90% de los microorganismos; NA: No aplica.

### 7.3 Detección de los elementos genéticos asociados a resistencia antimicrobiana

El gen *sul1* fue amplificado en el 1.6% (n=2) de los aislamientos de *S. maltophilia*, el 0.8% (n=1) de las muestras amplificó para el gen *sul2*, mientras que para *sul3* ninguno de los aislamientos analizados amplificó. Ninguno de los aislamientos presentó tanto los genes *sul1* como *sul2*.

### 7.4 Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF

Se analizaron 55 aislamientos previamente clasificados como resistentes a cloranfenicol, ciprofloxacina, levofloxacina y TMP-SXT. De estos aislamientos el 69.0% (n=38) sobreexpresó la bomba de eflujo SmeABC, el 60.0% (n=33) sobreexpresó la bomba SmeDEF y un 56.3% (n=31) sobreexpresó ambas bombas. Los resultados del análisis de correlación entre la susceptibilidad de los aislamientos de *S. maltophilia* con la sobreexpresión de las bombas de eflujo se muestran en la Tabla 7. La sobreexpresión de la bomba SmeABC mostró diferencia significativa en el aumento de los MICs de cloranfenicol ( $p=0.038$ ), gentamicina ( $p=0.001$ ), levofloxacina ( $p=0.017$ ) y TMP-SXT

( $p=0.045$ ), mientras que para la sobreexpresión de la bomba SmeDEF no se encontró diferencia significativa para los antimicrobianos probados.

**Tabla 7.** Relación de la susceptibilidad a los antimicrobianos con la expresión de SmeABC y SmeDEF en *S. maltophilia*.

| Bomba de eflujo | n (%)     | Media MIC (uL/mL) |             |             |             |             |             |             |           |           |           |
|-----------------|-----------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
|                 |           | (D.E.)            |             |             |             |             |             |             |           |           |           |
|                 |           | t-TEST            |             |             |             |             |             |             |           |           |           |
|                 |           | AMK               | GEN         | FEP         | CTX         | CAZ         | MEM         | CHL         | CIP       | LEV       | SXT       |
| SmeABC (+)      | 38 (69.0) | 38.7 (21.5)       | 12.9 (13.6) | 20.8 (10.6) | 52.2 (19.4) | 22.7 (11.2) | 20.8 (15.0) | 16.2 (8.5)  | 3.1 (1.2) | 2.2 (1.4) | 2.6 (1.2) |
| SmeABC (-)      | 17 (31.0) | 40.9 (21.1)       | 22.0 (25.2) | 22.2 (11.2) | 50.4 (22.6) | 26.0 (11.2) | 16.1 (13.3) | 23.2 (10.0) | 2.9 (1.3) | 3.0 (2.3) | 4.9 (7.0) |
| Valor de P      |           | 0.672             | 0.001**     | 0.733       | 0.429       | 0.2         | 0.326       | 0.038*      | 0.391     | 0.017*    | 0.045*    |

  

|            |           |             |             |             |             |             |             |             |           |           |           |
|------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| SmeDEF (+) | 33 (60.0) | 38.3 (21.8) | 16.4 (18.8) | 22.3 (10.5) | 51.8 (19.5) | 24.7 (10.6) | 20.3 (14.0) | 16.8 (8.8)  | 3.1 (1.2) | 2.3 (1.5) | 2.7 (1.1) |
| SmeDEF (-) | 22 (40.0) | 41.0 (20.6) | 14.7 (17.6) | 19.6 (11.0) | 51.3 (21.9) | 22.2 (12.1) | 17.9 (15.6) | 20.7 (10.3) | 2.9 (1.3) | 2.7 (1.2) | 4.4 (6.2) |
| Valor de P |           | 0.476       | 0.962       | 0.926       | 0.597       | 0.083       | 0.894       | 0.06        | 0.196     | 0.161     | 0.162     |

  

| ANOVA               |           |             |             |             |             |             |             |            |           |           |           |
|---------------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| SmeABC y SmeDEF (+) | 31 (56.3) | 37.6 (22.0) | 13.3 (14.8) | 21.6 (10.5) | 51.0 (19.8) | 24.2 (10.8) | 20.6 (14.4) | 16.3 (8.6) | 3.0 (1.2) | 2.2 (1.3) | 2.6 (1.1) |
| SmeABC y SmeDEF (-) | 15 (27.2) | 40 (20.8)   | 16.4 (20.3) | 20.9 (10.9) | 48.6 (22.8) | 25.2 (11.3) | 16.1 (13.7) | 23.2 (9.9) | 2.8 (1.3) | 3.1 (2.4) | 4.0 (3.3) |
| Valor de P          |           | 0.859       | 0.001**     | 0.376       | 0.672       | 0.194       | 0.749       | 0.084      | 0.616     | 0.414     | 0.290     |

D.E.:Desviación estándar; \*P<0.05; \*\*P<0.001.

## 7.5 Formación de biopelícula

De acuerdo con la clasificación dada por Stepanovic *et al.*, los rangos se establecieron de la siguiente manera: No productor:  $\leq 0.16$ , productor débil: 0.17 - 0.33, productor moderado: 0.34-0.66 y productor fuerte:  $\geq 0.67$ .

El 4.8% (n=6) del total de los aislamientos fue clasificado como no productor, un 7.9% (n=10) como productor débil, el 27% (n=34) fue clasificado como productor moderado, mientras que el 60.3% (n=76) se clasificó como productor fuerte.

## 8. DISCUSIÓN

Los microorganismos multifarmacorresistentes se han convertido en un importante problema de salud a nivel mundial. Son cada vez más frecuentes los reportes en donde *S. maltophilia* es el agente causal de diversas patologías como neumonías y bacteriemias. Mientras que en América Latina se ha reportado una frecuencia del 0.8% (Sader *et al.* 2004), la frecuencia a nivel mundial es del 1.6% (Sader *et al.* 2013).

En México, Flores-Treviño *et al.* reportaron en 2014 la caracterización de 119 aislamientos colectados en un periodo de 7 años. En el presente estudio, se analizaron 126 aislamientos colectados en un periodo de 2 años, pero además se excluyeron pacientes pediátricos. Lo anterior indica un aumento en la frecuencia de *S. maltophilia* en el área nosocomial en las regiones noreste y occidente del país. Sin embargo, no es posible realizar una comparación más certera debido a que en nuestro país no existen otros reportes sobre la frecuencia de las infecciones por *S. maltophilia*.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la recolección de las muestras en las diferentes salas hospitalarias, la frecuencia más alta se presentó en la UCI, lo cual concuerda con lo previamente reportado (Brooke 2012), debido principalmente al compromiso inmunológico y a la presencia de instrumentación en estos pacientes. *S. maltophilia* se ha asociado a infecciones del tracto respiratorio, lo que se puede corroborar al observar los resultados obtenidos en el presente trabajo, en donde el 59% de los aislamientos provenía de especímenes del tracto respiratorio tanto superior como inferior.

Se ha reportado que *S. maltophilia* posee resistencia tanto intrínseca como adquirida a numerosos agentes antimicrobianos (Chang *et al.* 2015). Lo anterior queda demostrado en este estudio, ya que los únicos antimicrobianos que mostraron una alta susceptibilidad fueron la levofloxacin con un 94.4% seguido del TMP-SXT con un 77.8%. El resto de los antimicrobianos presentó una susceptibilidad menor al 50%, incluyendo el meropenem con 4% de susceptibilidad. Los resultados para amikacina y el cefepime mostraron patrones de resistencia muy similares; más del 30% de los aislamientos fueron clasificados como intermedios para el cloranfenicol y la ciprofloxacina, lo que dificulta las opciones terapéuticas disponibles, ya que estos antimicrobianos son considerados como tratamiento de segunda línea. De manera

interesante, los resultados para las dos fluoroquinolonas analizadas (ciprofloxacina y levofloxacina) mostraron perfiles de susceptibilidad muy diferentes a pesar de estar clasificadas dentro del mismo grupo de antimicrobianos: el 94.4% de los aislamientos fue susceptible a levofloxacina y solo el 34.1% es susceptible para ciprofloxacina.

Los principales factores asociados son la sobreexpresión de bombas de eflujo, la baja permeabilidad de la membrana celular bacteriana, mutaciones en los genes codificadores de las subunidades A de la girasa y en menor proporción a mutaciones del área clave de unión en las subunidades B de esta misma enzima, lo que produce una alteración en su estructura y disminuye su afinidad con a los fármacos (Leyva y Leyva, 2008).

Al comparar los resultados obtenidos de los perfiles de resistencia para el TMP-SXT de *S. maltophilia* de este estudio con lo reportado a nivel mundial, se pueden observar similitudes con reportes de países asiáticos, tales como Taiwán y Corea del Sur, cuyos porcentajes de resistencia a este antimicrobiano ascienden hasta un 30% (Chung *et al.*, 2013; Chang *et al.* 2014). En México, uno de los pocos estudios sobre este microorganismo reporta un 32.8% de aislamientos resistentes, mientras que en este estudio se encontró una frecuencia del 22.2%, lo que coloca a México como uno de los países con mayor resistencia al TMP-SXT a nivel mundial (Flores-Treviño *et al.* 2014).

La resistencia al TMP-SXT en *S. maltophilia* ha sido ligada de manera importante con la presencia de los genes *sul* (Chung *et al.* 2015). Estos genes son los encargados de producir análogos estructurales de la enzima dihidropteroato sintetasa, la cual, a su vez, funciona como sitio de unión para el TMP-SXT (Liu *et al.* 2009).

Este es el primer estudio en México en el cual se determina la presencia de estos genes y aunque a diferencia de países asiáticos en donde la frecuencia reportada va desde un 12% hasta un 72% (Chung *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2016), en el presente trabajo, se encontró una baja frecuencia en estos genes, lo que sugiere que en nuestra población la resistencia al TMP-SXT no está ligada a *sul*. Otros mecanismos que pueden conferir resistencia al TMP-SXT en *S. maltophilia* son la presencia de los casetes genéticos *dfrA* ligados a integrones de clase 1 o la sobreexpresión de los sistemas de expulsión activa SmeDEF, TolCsm y SmeYZ (Huang *et al.* 2013b; Lin *et al.* 2015; Sánchez y Martínez, 2015).



En este estudio se encontraron diferencias en los perfiles de sobreexpresión de estas bombas de eflujo con lo anteriormente reportado a nivel mundial (Cho *et al.* 2012; Lin *et al.* 2015). El análisis de la expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeDEF arrojó resultados interesantes en ambos casos. Los aislamientos sometidos al ensayo de expresión fueron seleccionados debido a que presentaron perfiles de resistencia a ciprofloxacina, levofloxacina, cloranfenicol o TMP-SXT y aunque la sobreexpresión de SmeABC ha sido ligada principalmente con la resistencia a quinolonas,  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos y la sobreexpresión de SmeDEF con la resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol y TMP-SXT (Chang *et al.* 2015); después de analizar los patrones de resistencia para cada antimicrobiano con la sobreexpresión de los sistemas de eflujo, se encontró que el aumento promedio de la media de los MICs para gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina y TMP-SXT, es atribuible a la sobreexpresión de la bomba SmeABC. Hasta ahora la sobreexpresión de este sistema de expulsión activa no ha sido ligada con la resistencia a cloranfenicol o a TMP-SXT, por lo que este estudio sería el primero en reportar este hallazgo. Estudios posteriores son necesarios para explicar estos cambios en los perfiles de resistencia.

La sobreexpresión de SmeDEF por sí sola no pudo ser atribuida al aumento en los MICs de los aislamientos analizados; su sobreexpresión fue significativa solamente en conjunto con SmeABC, pero influyó solo en el aumento del MIC de la gentamicina. De manera particularmente interesante, el 56.3% (n=31) de estos aislamientos sobreexpresaron ambas bombas, el 69.0% (n=38) y el 60.0% (n=33) expresaron solamente la bomba SmeABC o SmeDEF, respectivamente; lo que justifica la resistencia de estos aislamientos a los antimicrobianos probados, mientras que el 27.2% (n=15) de los aislamientos no sobreexpresaron alguna de las bombas de eflujo analizadas a pesar de poseer MIC elevados. La resistencia a antimicrobianos como las fluoroquinolonas, los fenicoles o al TMP-SXT no puede ser directamente atribuida solo a la sobreexpresión de las bombas de eflujo, debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en este ensayo.

El análisis de la producción de biopelícula demostró que la mayoría de los aislamientos son clasificados como productores fuertes de biopelícula, ya que aproximadamente el 60% de estos fue clasificado dentro de esta categoría. En México, Flores-Treviño *et al.*, estudiaron la producción de biopelícula de aislamientos clínicos y

reportaron que el 47.9% de los aislamientos analizados fueron clasificados como productores débiles. Aparentemente, se observa un aumento en la capacidad de producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *S. maltophilia*, pero debido a que los resultados obtenidos en este estudio difieren de la metodología seguida por Flores-Treviño *et al.*, no es posible realizar una comparación precisa. Es importante mencionar este factor de virulencia favorece la transmisión horizontal de genes de resistencia a diversos antimicrobianos, lo que también podría explicar el aumento en los MICs de este patógeno (Brooke, 2014).

Finalmente, es necesario mencionar que la variabilidad genotípica y fenotípica de este microorganismo, los mecanismos intrínsecos de resistencia, la falta de criterios unificados para la interpretación de los resultados de susceptibilidad, la falta de metodologías unificadas para los diversos ensayos *in vitro*, la dificultad de transferir los resultados *in vitro* a la práctica clínica (Nicodemo y Paez, 2007) y la baja disponibilidad de estudios epidemiológicos en nuestro país dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por *S. maltophilia*.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se identificaron 126 aislamientos como *Stenotrophomonas maltophilia* mediante PCR.
2. La mayoría de los aislamientos clínicos (59%) de *S. maltophilia* se obtuvieron de muestras respiratorias.
3. El porcentaje de resistencia a TMP-SXT encontrado fue del 22.2%.
4. Se encontró una baja frecuencia de los genes *sul*, lo que sugiere otros mecanismos de resistencia al TMP-SXT.
5. La sobreexpresión de la bomba SmeABC se asoció a la resistencia a gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina y TMP-SXT.
6. La mayoría de los aislamientos resistentes presentaron alta producción de biopelícula.

## 10. PERSPECTIVAS

1. Detección de otros factores genéticos involucrados en resistencia a TMP-SXT.
2. Análisis de los perfiles de resistencia antimicrobiana en presencia y ausencia de biopelícula.
3. Determinación de factores genéticos involucrados en la formación de la biopelícula.
4. Determinación de la composición de la biopelícula de los aislamientos clínicos de *S. maltophilia*.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alavi P, Muller H, Cardinale M, Zachow C, Sanchez MB, Martinez JL, Berg G. 2013. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. PLoS One **8**(7): e67103.
- Alonso A, Martinez JL. 1997. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial Agents Chemotherapy **41**(5): 1140-1142.
- Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy **44**(7): 1778-1782.
- Avison MB, Higgins CS, von Heldreich CJ, Bennett PM, Walsh TR. 2001. Plasmid location and molecular heterogeneity of the L1 and L2 beta-lactamase genes of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrobial Agents Chemotherapy **45**(2): 413-419.
- Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centron D, Pineiro SA. 2004. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. Antimicrobial Agents Chemotherapy **48**(2): 666-669.
- Berg G, Martinez JL. 2015. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex?. Frontiers in Microbiology **6**: 241.
- Brooke JS. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clinical Microbiology Reviews **25**(1): 2-41.
- Brooke JS. 2014. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen. Expert Review of Anti-Infective Therapy **12**(1): 1-4.
- Burdge DR, Noble MA, Campbell ME, Krell VL, Speert DP. 1995. *Xanthomonas maltophilia* misidentified as *Pseudomonas cepacia* in cultures of sputum from patients with cystic fibrosis: a diagnostic pitfall with major clinical implications. Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals **20**:445– 448.

- Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Ramsey BW, Clausen CR. 1998. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals* **27**(1): 158-163.
- Candel FJ, Lopez R, Valdivia A, Nunez MJ, Roca-Arbones V, Picazo de la Garza JJ. 2002. Endocarditis due to *Stenotrophomonas maltophilia*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **20**(9): 477-478.
- Cerezer VG, Bando SY, Pasternak J, Franzolin MR, Moreira-Filho CA. 2014. Phylogenetic analysis of *Stenotrophomonas spp.* isolates contributes to the identification of nosocomial and community-acquired infections. *Biomed Research International* **2014**: 151405.
- Chang LL, Chen HF, Chang CY, Lee TM, Wu WJ. 2004. Contribution of integrons, and SmeABC and SmeDEF efflux pumps to multidrug resistance in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**(3), 518-521.
- Chang YT, Lin CY, Lu PL, Lai CC, Chen TC, Chen CY. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection: comparison between community-onset and hospital-acquired infections. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **47**, 28–35.
- Chang YT, Lin CY, Chen YH, Hsueh PR. 2015. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in Microbiology* **6**:893.
- Chastre J, Fagon JY. 2002. Ventilator-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **165**(7): 867-903.
- Chawla K, Vishwanath S, Gupta A. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia* in Lower Respiratory Tract Infections. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **8**(12): DC20-22.
- Cho HH, Sung JY, Kwon KC, Koo SH. 2012. Expression of Sme efflux pumps and multilocus sequence typing in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Annals of Laboratory Medicine* **32**(1): 38-43.

- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology* **22**(6): 996-1006.
- Chung HS, Hong SG, Kim YR, Shin KS, Whang DH, Ahn JY, Park YJ, Uh Y, Chang CL, Shin JH, Lee HS, Lee K, Chong Y. 2013. Antimicrobial Susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from Korea, and the Activity of Antimicrobial Combinations against the Isolates. *Journal of Korean Medical Science*, **28**(1), 62–66.
- Chung HS, Kim K, Hong SS, Hong SG, Lee K, Chong Y. 2015. The *sul1* gene in *Stenotrophomonas maltophilia* with high-level resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole. *Annals of Laboratory Medicine* **35**(2): 246-249.
- Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th Informational Supplement M100–S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream MA, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR, Avison MB. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology* **9**(4): R74.
- Cystic Fibrosis Foundation. 2002. Patient registry 2001, p 1-28. Annual report Cystic Fibrosis. Bethesda, Md.
- de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcantara N, Martinez MB, Giron JA. 2003. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cellular Microbiology* **5**(9): 625-636.
- de Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Martinez MB, Giron JA. 2002. Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerging Infectious Diseases Journal-CDC* **8**(9): 918-923.

- del Toro MD, Rodriguez-Bano J, Herrero M, Rivero A, Garcia-Ordóñez MA, Corzo J, Peres-Cano R. 2002. Clinical epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* colonization and infection: a multicenter study. *Medicine (Baltimore)* **81**:228–239.
- Denton M, Kerr KG. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**(1): 57-80.
- Denton M, Todd NJ, Kerr KG, Hawkey PM, Littlewood JM. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(7): 1953-1958.
- Di Bonaventura G, Spedicato I, D'Antonio D, Robuffo I, Piccolomini R. 2004. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **48**, 151–160.
- Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Rafailidis PI, Kapaskelis AM, Dimopoulos G. 2009. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review of the literature. *Future Microbiology* **4**(9): 1103-1109.
- Fernández L, Hancock REW. 2012. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **25**(4): 661–681.
- Finlay BB, Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(2): 136-169.
- Flores-Treviño S, Gutierrez-Ferman JL, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Estrada-Rivadeneira D, Rivas-Morales C, Llaca-Diaz JM, Camacho-Ortiz A, Mendoza-Olazarán S, Garza-Gonzalez E. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico: antimicrobial resistance, biofilm formation and clonal diversity. *Journal of Medical Microbiology* **63**(Pt 11): 1524-1530.
- García-León G, Ruiz de Alegria Puig C, García de la Fuente C, Martínez-Martínez L, Martínez JL, Sánchez MB. 2015. High-level quinolone resistance is associated with the overexpression of *smeVWX* in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *Clinical Microbiology and Infection* **21**(5): 464-467.



- Gardner P, Griffin WB, Swartz MN, Kunz LJ. 1970. Non-fermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest. *The American Journal of Medicine* 1970; 48:735-749.
- Gordon NC, Wareham DW. 2010. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35(3): 219-226.
- Gould VC, Okazaki A, Avison MB. 2013. Coordinate hyperproduction of SmeZ and SmeJK efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(1): 655-657.
- Gülmez D, Hasand G. 2005. *Stenotrophomonas maltophilia*: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital. *Clinical Microbiology and Infection* 11:880.
- Gutierrez F, Masia MM, Cortes J, Ortiz V, Mainar V, Vilar A. 1996. Endocarditis caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: case report and review. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals* 23(6): 1261-1265.
- Heath T, Currie B. 1995. Nosocomial and community-acquired *Xanthomonas maltophilia* infection in tropical Australia. *Journal of Hospital Infection* 30(4): 309-313.
- Howe RA, Wilson MP, Walsh TR, Millar MR. 1997. Susceptibility testing of *Stenotrophomonas maltophilia* to carbapenems. *Journal Antimicrobial Chemotherapy: Oxford Journals* 40:13-17.
- Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang XZ, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB. 2011. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37(3): 230-234.
- Huang YW, Hu RM, Yang TC. 2013b. Role of the pcm-tolCsm operon in the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68, 1987-1993.
- Huang YW, Lin CW, Hu RM, Lin YT, Chung TC, Yang TC. 2010. AmpN-AmpG operon is essential for expression of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(6): 2583-2589.

- Huedo P, Yero D, Martinez-Servat S, Estibariz I, Planell R, Martinez P, Ruyra A, Roher N, Roca I, Vila J, Daura X, Gibert I. 2014. Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *Journal of Bacteriology* **196**(13): 2431-2442.
- Hugh R, Ryschenkow E. 1961. *Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species. *Journal of General Microbiology* **26**: 123-132.
- Jones RN. 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals* **51**: S81–S87.
- Jucker BA, Harms H, Zehnder AJ. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology* **178**(18): 5472-5479.
- Julve R, Rovira E, Belda A, Prat J, Escoms R, Albert A, Gonzalvo F. 1998. Clinical manifestations of *Stenotrophomas (Xanthomonas) maltophilia* infection. *Anales de Medicina Interna* **15**(9): 476-480.
- Labarca JA, Leber AL, Kern VL, Territo MC, Brankovic LE, Bruckner DA, Pegues DA. 2000. Outbreak of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in allogenic bone marrow transplant patients: role of severe neutropenia and mucositis. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals* **30**(1): 195-197.
- Lambert T, Ploy MC, Denis F, Courvalin P. 1999. Characterization of the chromosomal aac(6')-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **43**(10): 2366-2371.
- Leyva S, Leyva E. 2008. Fluoroquinolonas. mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín de la Sociedad Química de México* **2**(1), 1-13.
- Lin YT, Huang YW, Chen SJ, Chang CW, Yang TC. 2015. SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence to mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **59**, 4067–4073.

- Liu J, Keelan P, Bennett PM, Enne VI. 2009. Characterization of a novel macrolide efflux gene, *mef(B)*, found linked to *sul3* in porcine *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 423-426.
- Mahdi O, Eklund B, Fisher N. 2014. Laboratory culture and maintenance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Current Protocols in Microbiology* **32**: Unit 6F 1.
- Milne KE, Gould IM. 2012. Combination antimicrobial susceptibility testing of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **56**(8): 4071-4077.
- Muñoz-Bellido JL, Muñoz-Criado S, García-García I, Alonso-Manzanares MA, Gutiérrez-Zufiaurre MN, García-Rodríguez JA. 1997. In vitro activities of b-lactam-b-lactamase inhibitor combinations against *Stenotrophomonas maltophilia*: Correlation between methods for testing inhibitory activity, time-kill curves, and bactericidal activity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **41**: 2621-2615.
- Mosquito S, Ruiz J, Pons MJ, Durand D, Barletta F, Ochoa TJ. 2012. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in diarrhoeagenic *Escherichia coli* isolated from children. *International Journals of Antimicrobial Agents* **40**(6): 544-548.
- Neal DJ, Wilkinson SG. 1982. Lipopolysaccharides from *Pseudomonas maltophilia*. Structural studies of the side-chain, core, and lipid-A regions of the lipopolysaccharide from strain NCTC 10257. *European Journal of Biochemistry* **128**(1): 143-149.
- Newton BA. 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological Reviews* **20**:14–17.
- Nicodemo AC, García JI. 2007. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **26**:229–237.
- Nikaido H, Pagès JM. 2012. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **36**:340 –363.
- Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H, Dewavrin F, Tissier S, Diarra M, Boulo M, Durocher A. 2006. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Critical Care* **10**(5): R143.

- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Palleroni NJ, Bradbury JF. 1993. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(3): 606-609.
- Passerini de Rossi B, Calenda M, Vay C, Franco M. 2007. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from device-associated nosocomial infections. *Revista Argentina de Microbiología* **39**(4): 204-212.
- Pinot C, Deredjian A, Nazaret S, Brothier E, Cournoyer B, Segonds C, Favre-Bonte S. 2011. Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. *Journal of Applied Microbiology* **111**: 1185-1193.
- Podschun R, Fischer A, Ullman U. 2000. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. *Journal of Medical Microbiology* **49**(2): 115-119.
- Pompilio A, Pomponio S, Crocetta V, Gherardi G, Verginelli F, Fiscarelli E, Dicuonzo G, Savini V, D'Antonio D, Di Bonaventura G. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiology* **11**, 159.
- Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* **30**: 285- 293.
- Rios-Licea MM, Bosques FJ, Arroliga AC, Galindo-Galindo JO, Garza-Gonzalez E. 2010. Quadruplex real-time quantitative PCR assay for the detection of pathogens related to late-onset ventilator-associated pneumonia: a preliminary report. *Journal of Microbiological Methods* **81**(3): 232-234.
- Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D, Dow JM. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* **7**(7): 514-525.

- Sader HS, Flamm RK, Jones RN. 2013. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*. **76**,217–221.
- Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC, SENTRY Participants Group (LatinAmerica). 2004. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. **8**,25–79.
- Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL. 2009. *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiology* **4**(6): 655-660.
- Sánchez MB, Martínez L. 2015. The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **59**, 4347–434.
- Schembri MA, Sokurenko EV, Klemm P. 2000. Functional flexibility of the FimH adhesin: insights from a random mutant library. *Infection and Immunity* **68**(5): 2638-2646.
- Schindler M, Osborn MJ. 1979. Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry* **18**:4425–4430.
- Senol E. 2004. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infections* **57**(1): 1-7.
- Senol E, DesJardin J, Stark PC, Barefoot L, Snyderman DR. 2002. Attributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases: Oxford Journals* **34**(12): 1653-1656.
- Sevillano D, Valdezate S, Gomez-Lus ML. 2001. An update on the susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Revista Española de Quimioterapia* **14**(2): 138-154.
- Swings J, De Vos P, Van den Mooter M, De Ley J. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981). *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**:409.
- Toleman MA, Bennett PM, Bennett DM, Jones RN, Walsh TR. 2007. Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* mediated by acquisition of sul genes. *Emerging Infectious Diseases Journal-CDC* **13**(4): 559-565.

- Victor MA, Arpi M, Bruun B, Jonsson V, Hansen MM. 1994. *Xanthomonas maltophilia* bacteremia in immunocompromised hematological patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **26**(2): 163-170.
- Vila J, Marco F. 2010. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **28**(10): 726-736.
- Villarino ME, Stevens LE, Schable B, Mayers G, Miller JM, Burke JP, Jarvis WR. 1992. Risk factors for epidemic *Xanthomonas maltophilia* infection/colonization in intensive care unit patients. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **13**(4): 201-206.
- Wang A, Wang Q, Kudinha T, Xiao S, Zhuo S. 2016. Effects of Fluoroquinolones and Azithromycin on Biofilm Formation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Scientific Reports*. **6**, 29701
- Waters VJ, Gomez MI, Soong G, Amin S, Ernst RK, Prince A. 2007. Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infection and Immunity* **75**(4): 1698-1703.
- Weiss K, Restieri C, Carolis E, Laverdière M, Guay H. 2000. Comparative activity of new quinolones against 326 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**: 363-365.
- World Health Organization. 2000. Public health importance of antimicrobial resistance. Disponible en: [www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/en/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/)
- Wu K, Yau YCW, Matukas L, Waters V. 2013. Biofilm compared to conventional antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **57**(3), 1546–1548.
- Wu C, Huang Y, Lin Y, Ning H, Yang T. 2016. Inactivation of SmeSyRy Two-Component Regulatory System Inversely Regulates the Expression of SmeYZ and SmeDEF Efflux Pumps in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS ONE* **11**(8): e0160943.
- Zanetti F, De Luca G, Sacchetti R. 2009. Control of bacterial contamination in microfiltered water dispensers (MWDs) by disinfection. *International Journal of Food Microbiology* **128**(3): 446-452.

- Zbinden A, Böttger EC, Bosshard PP, Zbinden R. 2007. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of Gram-negative non-fermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2270-2273.
- Zgair AK, Chhibber S. 2011. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *International Journal of Food Microbiology* **60**:1032.
- Zhang L, Li XZ, Poole K. 2000. Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(2): 287-293.
- Zhang L, Li XZ, Poole K. 2001. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(12): 3497-3503.
- Zhao J, Xing Y, Liu W, Ni W, Wei C, Wang R, Liu Y, Liu Y. 2016. Surveillance of Dihydropteroate Synthase Genes in *Stenotrophomonas maltophilia* by LAMP: Implications for Infection Control and Initial Therapy. *Frontiers in Microbiology* **7**:1723.
- Zhuo C, Zhao Q, Xiao S. 2014. The Impact of *spgM*, *rpfF*, *rmlA* Gene Distribution on Biofilm Formation in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS ONE* **9**(10): e108409.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Sandra Abril Herrera Heredia

Candidato (a) para el grado de:

Maestro (a) en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Stenotrophomonas maltophilia* EN DOS HOSPITALES DE TERCER NIVEL DE MÉXICO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido (a) en Valladolid, Yucatán, México; el 23 de mayo de 1990.

Educación: Egresado (a) de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Clínico Biólogo en 2012 en la Facultad de Medicina.



## ANEXO I

### Preparación de reactivos y soluciones

**Agua-DEPC al 0.1%.** Añadir 1 mL de DEPC por cada litro de H<sub>2</sub>O previamente esterilizada, incubar de 12-14 h a 37°C con agitación. Esterilizar nuevamente.

**Bromuro de etidio, 0.5 mg/mL (Solución Stock).** Diluir 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

**Bromuro de etidio, 2 µg/mL.** Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock y 249 mL de agua ultrapura). Almacenarse en la oscuridad.

**Buffer de fosfatos 0.01 M pH 7.2.** Disolver 0.4267 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3470 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua destilada, ajustar pH a 7.2 y aforar a 500 mL.

**EDTA 500 mM.** Disolver 18.62 g de EDTA en 100 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.

**Gel agarosa al 2%.** Disolver 4 g de agarosa en 200 mL de TBE 1X, calentar en microondas hasta fundir, agregando 20 µL de bromuro de etidio 2 µg/mL y vaciar en la cámara de electroforesis.

**Jugo azul 5X (Buffer de carga para electroforesis).** Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE IX pH 8 y aforar a 10 mL.

**TBE 10X.** Disolver 27 g de Tris-base, 13.7 g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua destilada, ajustar a pH 8 y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

**TBE 0.5X.** Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1L con agua destilada.

## ANEXO II

### Características fenotípicas y genotípicas de los aislamientos clínicos de *Stenotrophomonas maltophilia* incluidos en este estudio

| Aislamiento | Origen | Fecha    | Sala        | Especimen | Antimicrobiano |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Genes de resistencia al TMP-SXT |      |      | Producción de biopelícula | Sobreexpresión de bombas de eflujo |        |
|-------------|--------|----------|-------------|-----------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|------|------|---------------------------|------------------------------------|--------|
|             |        |          |             |           | AMK            | GEN | CTX | CAZ | FEP | CHL | CIP | LEV | MEM | SXT | sul1                            | sul2 | sul3 |                           | SmeABC                             | SmeDEF |
| 13-1318     | MTY    | 16/08/13 | PENS        | LP        | S              | S   | R   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 13-1319     | MTY    | 16/08/13 | SD          | Absceso   | R              | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 13-1320     | MTY    | 20/08/13 | CXP         | Herida    | R              | R   | R   | R   | I   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 13-1537     | MTY    | 03/09/13 | UCIA        | Sangre    | R              | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | -                               | +    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 13-1538     | MTY    | 06/09/13 | PQ          | Sangre    | R              | S   | R   | I   | I   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 13-1577     | MTY    | 11/09/13 | Interna I   | Tráquea   | S              | S   | R   | I   | I   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 13-1698     | MTY    | 21/09/13 | Interna III | Tráquea   | I              | R   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 13-1725     | MTY    | 26/09/13 | CX AB       | Tráquea   | I              | R   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | +      |
| 13-1746     | MTY    | 23/09/13 | SD          | Espuito   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 13-1761     | MTY    | 25/09/13 | SD          | LBA       | I              | S   | R   | R   | I   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 13-1798     | MTY    | 28/09/13 | Interna II  | Sangre    | R              | R   | R   | S   | R   | I   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | -      |
| 13-1888     | MTY    | 11/10/13 | UCIA        | Tráquea   | I              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 13-1917     | MTY    | 13/10/13 | SD          | Sangre    | I              | S   | I   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 13-2052     | MTY    | 26/10/13 | Interna III | Espuito   | R              | S   | R   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 13-2148     | MTY    | 04/11/13 | UCIA        | Tráquea   | I              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 13-2231     | MTY    | 07/11/13 | SD          | Piel      | I              | I   | R   | R   | I   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 13-2401     | MTY    | 19/11/13 | Interna I   | LBA       | S              | S   | I   | S   | I   | I   | R   | R   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | -                                  | -      |
| 13-2632     | MTY    | 18/12/13 | Interna II  | Sangre    | I              | R   | I   | S   | S   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | NP                        | +                                  | +      |
| 13-2648     | MTY    | 24/12/13 | SD          | Tráquea   | R              | S   | R   | S   | I   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0053     | MTY    | 02/01/14 | PQ          | Tráquea   | I              | S   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0130     | MTY    | 11/01/14 | SD          | Tráquea   | I              | S   | R   | R   | I   | I   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 14-0143     | MTY    | 08/01/14 | CX AC       | Tráquea   | S              | S   | S   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0225     | MTY    | 17/01/14 | SD          | Sangre    | S              | S   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | I   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | -      |
| 14-0268     | MTY    | 24/01/14 | PQ          | Secreción | S              | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | -                                  | -      |
| 14-0298     | MTY    | 28/01/14 | PQ          | Tráquea   | R              | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 14-0299     | MTY    | 04/02/14 | CX AC       | Tráquea   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | -                                  | +      |
| 14-0472     | MTY    | 10/02/14 | UCIA        | Tráquea   | R              | R   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-0504     | MTY    | 10/02/14 | PQ          | Tráquea   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | -                                  | -      |
| 14-0577     | MTY    | 13/02/14 | CXP         | Hueso     | R              | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 14-0659     | MTY    | 20/02/14 | CXP         | Escara    | R              | R   | R   | R   | R   | S   | R   | I   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-0893     | MTY    | 17/03/14 | UCIA        | Tráquea   | R              | R   | I   | S   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0927     | MTY    | 17/03/14 | PQ          | Catéter   | I              | S   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0939     | MTY    | 22/03/14 | UCIA        | Tráquea   | R              | R   | R   | R   | I   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0974     | MTY    | 21/03/14 | Interna II  | LBA       | I              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-0978     | MTY    | 23/03/14 | Cx AB       | Drenaje   | S              | S   | I   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | I   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-1035     | MTY    | 31/03/14 | SD          | Tráquea   | S              | S   | R   | R   | I   | R   | R   | R   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-1075     | MTY    | 05/04/14 | SD          | Tráquea   | S              | I   | I   | S   | S   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |

## Anexo II. (Continuación)

| Aislamiento | Origen | Fecha    | Sala        | Especimen | Antimicrobiano |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Genes de resistencia al TMP-SXT |      |      | Producción de biopelícula | Sobreexpresión de bombas de eflujo |        |
|-------------|--------|----------|-------------|-----------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|------|------|---------------------------|------------------------------------|--------|
|             |        |          |             |           | AMK            | GEN | CTX | CAZ | FEP | CHL | CIP | LEV | MEM | SXT | sul1                            | sul2 | sul3 |                           | SmeABC                             | SmeDEF |
| 14-1159     | MTY    | 22/04/14 | PQ          | Tráquea   | S              | S   | I   | I   | I   | R   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | NP                        | +                                  | +      |
| 14-1219     | MTY    | 30/04/14 | SD          | Tráquea   | S              | S   | R   | I   | I   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 14-1226     | MTY    | 29/04/14 | UCIA        | Tráquea   | I              | I   | I   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | +                               | -    | -    | PD                        | -                                  | -      |
| 15-0434     | MTY    | 18/02/15 | SD          | Espuito   | S              | I   | R   | R   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0435     | MTY    | 21/02/15 | Interna II  | Espuito   | R              | R   | R   | R   | I   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-0436     | MTY    | 25/02/15 | PQ          | Orina     | I              | R   | R   | R   | I   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0534     | MTY    | 06/03/15 | UCIA        | Tráquea   | I              | R   | I   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-0615     | MTY    | 12/03/15 | UCIA        | LBA       | R              | R   | R   | R   | I   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-0709     | MTY    | 26/03/15 | SD          | LBA       | S              | S   | I   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0852     | MTY    | 13/04/15 | UCIA        | Sangre    | R              | R   | R   | R   | I   | R   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 15-0914     | MTY    | 19/04/15 | Interna II  | Catéter   | I              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1031     | MTY    | 27/04/15 | PENS        | LPL       | I              | R   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1121     | MTY    | 10/05/15 | GINE        | Sangre    | S              | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1122     | MTY    | 13/05/15 | SD          | Sangre    | S              | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1176     | MTY    | 13/05/15 | Interna III | Espuito   | R              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1231     | MTY    | 22/05/15 | PQ          | LBA       | I              | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | -      |
| 15-1250     | MTY    | 29/05/15 | CX AB       | Espuito   | R              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1395     | MTY    | 05/06/15 | Interna I   | Sangre    | S              | S   | S   | R   | R   | I   | S   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-1075     | MTY    | 05/04/14 | SD          | Tráquea   | S              | I   | I   | S   | S   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 14-1159     | MTY    | 22/04/14 | PQ          | Tráquea   | S              | S   | I   | I   | I   | R   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | NP                        | +                                  | +      |
| 14-1219     | MTY    | 30/04/14 | SD          | Tráquea   | S              | S   | R   | I   | I   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 14-1226     | MTY    | 29/04/14 | UCIA        | Tráquea   | I              | I   | I   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | +                               | -    | -    | PD                        | -                                  | -      |
| 14-1227     | MTY    | 24/04/14 | Interna II  | Abceso    | S              | I   | I   | R   | S   | R   | S   | S   | I   | R   | +                               | -    | -    | PD                        | -                                  | -      |
| 14-1239     | MTY    | 25/04/14 | PENS        | Tejido    | I              | S   | R   | R   | S   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | -      |
| 14-1342     | MTY    | 07/05/14 | Interna II  | LPL       | R              | R   | R   | I   | I   | I   | S   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-1582     | MTY    | 26/05/14 | CX AC       | Tráquea   | S              | S   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-1612     | MTY    | 07/06/14 | UCIA        | Herida    | I              | R   | S   | S   | S   | I   | R   | I   | R   | S   | -                               | -    | -    | NP                        | +                                  | +      |
| 14-1706     | MTY    | 21/06/14 | PQ          | Tráquea   | R              | R   | S   | S   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-1889     | MTY    | 05/07/14 | UCIA        | Sangre    | S              | S   | R   | R   | I   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-1907     | MTY    | 05/07/14 | Interna II  | Catéter   | I              | I   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 14-1930     | MTY    | 15/07/14 | SD          | Herida    | I              | R   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-1957     | MTY    | 13/07/14 | PENS        | Espuito   | I              | R   | R   | S   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 14-2013     | MTY    | 13/07/14 | Interna I   | Tráquea   | R              | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | -                                  | -      |
| 14-2026     | MTY    | 21/07/14 | SD          | Espuito   | S              | S   | I   | I   | S   | R   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-2046     | MTY    | 24/07/14 | Interna I   | Espuito   | S              | S   | R   | R   | I   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-2123     | MTY    | 30/07/14 | Cx AC       | Tráquea   | R              | R   | R   | I   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-2139     | MTY    | 31/07/14 | PQ          | LBA       | S              | S   | I   | I   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-2152     | MTY    | 02/08/14 | SD          | Sangre    | R              | R   | I   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-2249     | MTY    | 18/08/14 | UCIA        | Tráquea   | S              | S   | R   | R   | R   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |

## Anexo II. (Continuación)

| Aislamiento | Origen | Fecha    | Sala        | Especimen | Antimicrobiano |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Genes de resistencia al TMP-SXT |      |      | Producción de biopelícula | Sobreexpresión de bombas de eflujo |        |
|-------------|--------|----------|-------------|-----------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|------|------|---------------------------|------------------------------------|--------|
|             |        |          |             |           | AMK            | GEN | CTX | CAZ | FEP | CHL | CIP | LEV | MEM | SXT | sul1                            | sul2 | sul3 |                           | SmeABC                             | SmeDEF |
| 14-2346     | MTY    | 29/08/14 | SD          | LBA       | R              | R   | S   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 14-2365     | MTY    | 28/08/14 | SD          | Sangre    | S              | S   | I   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 14-2376     | MTY    | 02/09/14 | Interna I   | LBA       | R              | R   | R   | R   | I   | I   | R   | I   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-2419     | MTY    | 09/09/14 | PQ          | Catéter   | R              | R   | R   | I   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-2454     | MTY    | 13/09/14 | CX AC       | Herida    | S              | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 14-2456     | MTY    | 15/09/14 | Interna I   | Espuito   | I              | S   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-2464     | MTY    | 17/09/14 | UCIA        | LBA       | R              | R   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 14-2496     | MTY    | 18/09/14 | PENS        | Herida    | S              | I   | I   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | NP                        | +                                  | +      |
| 14-2780     | MTY    | 07/10/14 | PQ          | Tráquea   | I              | I   | R   | R   | R   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 14-2810     | MTY    | 11/10/14 | PQ          | Orina     | S              | S   | R   | R   | I   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 14-2845     | MTY    | 16/10/14 | SD          | Sangre    | I              | I   | I   | I   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | NP                        | NA                                 | NA     |
| 14-3002     | MTY    | 31/10/14 | Trauma      | Tobillo   | I              | R   | R   | S   | I   | R   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | NP                        | +                                  | -      |
| 14-3038     | MTY    | 04/11/14 | Interna I   | Espuito   | S              | S   | R   | S   | I   | I   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 14-3113     | MTY    | 14/11/14 | SD          | Tráquea   | I              | R   | S   | S   | S   | I   | I   | S   | I   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 14-3142     | MTY    | 18/11/14 | UCIA        | Tráquea   | I              | I   | R   | R   | I   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 14-3230     | MTY    | 25/11/14 | SD          | LBA       | S              | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 14-3231     | MTY    | 19/11/14 | Interna II  | LBA       | S              | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 14-3282     | MTY    | 21/11/14 | UCIA        | LBA       | R              | R   | R   | R   | I   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 14-3283     | MTY    | 27/11/14 | SD          | LBA       | R              | R   | R   | R   | I   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0022     | MTY    | 08/01/15 | Interna I   | Sangre    | R              | R   | I   | S   | S   | I   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | -      |
| 15-0091     | MTY    | 15/01/15 | SD          | Tráquea   | I              | R   | I   | S   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0169     | MTY    | 30/01/15 | SD          | Tráquea   | R              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 15-0294     | MTY    | 16/02/15 | PQ          | Tráquea   | I              | I   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0434     | MTY    | 18/02/15 | SD          | Espuito   | S              | I   | R   | R   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0435     | MTY    | 21/02/15 | Interna II  | Espuito   | R              | R   | R   | R   | I   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-0436     | MTY    | 25/02/15 | PQ          | Orina     | I              | R   | R   | R   | I   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0534     | MTY    | 06/03/15 | UCIA        | Tráquea   | I              | R   | I   | S   | S   | I   | S   | S   | S   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-0615     | MTY    | 12/03/15 | UCIA        | LBA       | R              | R   | R   | R   | I   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-0709     | MTY    | 26/03/15 | SD          | LBA       | S              | S   | I   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-0852     | MTY    | 13/04/15 | UCIA        | Sangre    | R              | R   | R   | R   | I   | R   | R   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | +      |
| 15-0914     | MTY    | 19/04/15 | Interna II  | Catéter   | I              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1031     | MTY    | 27/04/15 | PENS        | LPL       | I              | R   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1121     | MTY    | 10/05/15 | GINE        | Sangre    | S              | S   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1122     | MTY    | 13/05/15 | SD          | Sangre    | S              | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1176     | MTY    | 13/05/15 | Interna III | Espuito   | R              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1231     | MTY    | 22/05/15 | PQ          | LBA       | I              | I   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | +                                  | -      |
| 15-1250     | MTY    | 29/05/15 | CX AB       | Espuito   | R              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1395     | MTY    | 05/06/15 | Interna I   | Sangre    | S              | S   | S   | R   | R   | I   | S   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1547     | GDL    | 25/06/15 | 617         | SD        | R              | R   | I   | S   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1548     | GDL    | 09/07/14 | 728/UC15    | SD        | R              | R   | I   | S   | R   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |

## Anexo II. (Continuación)

| Aislamiento | Origen | Fecha    | Sala        | Especimen | Antimicrobiano |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Genes de resistencia al TMP-SXT |      |      | Producción de biopelícula | Sobreexpresión de bombas de eflujo |        |
|-------------|--------|----------|-------------|-----------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|------|------|---------------------------|------------------------------------|--------|
|             |        |          |             |           | AMK            | GEN | CTX | CAZ | FEP | CHL | CIP | LEV | MEM | SXT | sul1                            | sul2 | sul3 |                           | SmeABC                             | SmeDEF |
| 15-1549     | GDL    | 25/06/15 | 707         | SD        | I              | R   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1550     | GDL    | 25/06/15 | UR          | SD        | I              | R   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1551     | GDL    | 23/08/14 | JV          | LPL       | R              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1552     | GDL    | 25/06/15 | FA23        | Sangre    | R              | R   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | -      |
| 15-1554     | GDL    | 30/09/14 | SGD19       | SD        | S              | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1557     | GDL    | 25/06/15 | 714         | Sangre    | S              | S   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1558     | GDL    | 25/06/15 | 518         | Secreción | S              | S   | I   | S   | S   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1559     | GDL    | 13/12/14 | 701         | Secreción | S              | S   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1560     | GDL    | 25/06/15 | 827         | LCR       | S              | I   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1561     | GDL    | 25/06/15 | PG 28       | SB        | R              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PM                        | -                                  | -      |
| 15-1564     | GDL    | 25/06/15 | 712         | Herida    | R              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1566     | GDL    | 25/06/15 | 813         | Tráquea   | S              | S   | S   | S   | S   | I   | R   | S   | S   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | -                                  | -      |
| 15-1568     | GDL    | 25/06/15 | JV          | Sangre    | R              | R   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1691     | MTY    | 01/07/15 | CX AB       | Tráquea   | I              | I   | R   | R   | R   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PD                        | NA                                 | NA     |
| 15-1598     | MTY    | 01/07/15 | SD          | Espuito   | I              | I   | R   | I   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1677     | MTY    | 01/07/15 | PQ          | LBA       | R              | R   | R   | R   | I   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1679     | MTY    | 02/07/15 | UCIA        | Tráquea   | I              | R   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PM                        | NA                                 | NA     |
| 15-1843     | MTY    | 16/07/15 | Interna II  | LBA       | I              | R   | I   | S   | S   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1847     | MTY    | 17/07/15 | UR          | SB        | I              | I   | R   | R   | I   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1848     | MTY    | 23/07/15 | SD          | Tráquea   | S              | I   | R   | R   | I   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1849     | MTY    | 17/07/15 | PQ          | Tráquea   | S              | R   | I   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-1935     | MTY    | 22/07/15 | Interna III | Espuito   | I              | I   | R   | I   | R   | S   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-1949     | MTY    | 28/07/15 | SD          | Espuito   | S              | I   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-2026     | MTY    | 04/08/15 | Interna III | Espuito   | R              | R   | R   | R   | R   | S   | I   | S   | R   | R   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-2068     | MTY    | 03/08/15 | PQ          | LBA       | R              | R   | R   | I   | S   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-2150     | MTY    | 12/08/15 | SD          | Espuito   | I              | I   | I   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-2428     | GDL    | 08/07/15 | 701         | Úlcera    | R              | R   | R   | R   | R   | I   | S   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |
| 15-2743     | GDL    | 21/07/15 | SD          | SB        | R              | R   | R   | R   | R   | I   | R   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | +                                  | +      |
| 15-2744     | GDL    | 21/07/15 | SD          | SB        | I              | R   | R   | R   | R   | I   | I   | S   | R   | S   | -                               | -    | -    | PF                        | NA                                 | NA     |

MTY: Monterrey; GDL: Guadalajara; SD: Sin datos; PENS: Pensionistas; UCIA: Unidad de Cuidados Intensivos Adultos; CXP: Cirugía plástica; UR: urgencias; GINE: Ginecología; PQ: Cuidados post quirúrgicos; CX AB: Cirugía AB; CX AC: Cirugía AC; LP: Líquido peritoneal; LPL: Líquido pleural; SB: Secreción bronquial; AMK: Amikacina; GEN: Gentamicina; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidime; FEP: Cefepime; CHL: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; MEM: Meropenem; TMP-SXT: Trimetopri-sulfametoxazol; NP: No productor; PD: Productor débil; PM: Productor moderado; PF: Productor fuerte; NA: No Aplica.